ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON LIPOPROTEINEN AUS ASZITES MALIGNER GENESE

Wolfgang Caselmann

Diss
München
1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546827_0025

Aus der Medizinischen Klinik II
des Klinikums Großhadern
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. G. Paumgartner

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON LIPOPROTEINEN AUS ASZITES MALIGNER GENESE

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolfgang Caselmann
aus Bayreuth

München 1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Priv.-Doz. Dr. med. D. Jüngst

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. G. Paumgartner

Dekan : Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juli 1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Meinen Eltern

in Dankbarkeit
gewidmet

München 1984

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	E I N L E I T U N G	1
1.1.	LITERATURÜBERSICHT	1
1.2.	PROBLEMSTELLUNG	5
2.	M A T E R I A L und M E T H O D E N	6
2.1.	PATIENTENKOLLEKTIV	6
2.1.1.	Karzinome des Gastrointestinal-trakts	6
2.1.2.	Gynäkologische Karzinome	8
2.1.2.1.	Ovarialkarzinome	8
2.1.2.2.	Mammakarzinome	8
2.2.	VORBEREITUNG DES PROBENMATERIALS	9
2.3.	METHODIK	10
2.3.1.	Quantifizierung des Protein-, Cholesterin-, Triglyzerid- und Phospholipidgehalts	10
2.3.1.1.	Reagenzien und Geräte	10
2.3.1.2.	Proteinbestimmung	11
2.3.1.3.	Cholesterinbestimmung	11
2.3.1.4.	Triglyzeridbestimmung	11

		Seite
2.3.1.5.	Phospholipidbestimmung	12
2.3.1.5.1.	Gesamtphospholipide	12
2.3.1.5.2.	Quantitative dünnschichtchromatographische Auftrennung in Einzelkomponenten	12
2.3.2.	Gelfiltrationschromatographische Fraktionierung des Aszites	13
2.3.2.1.	Reagenzien und Geräte	13
2.3.2.2.	Durchführung	14
2.3.3.	Immundiffusion nach Ouchterlony	16
2.3.3.1.	Reagenzien und Geräte	16
2.3.3.2.	Durchführung	17
2.3.4.	Gradientenultrazentrifugation	18
2.3.4.1.	Reagenzien und Geräte	18
2.3.4.2.	Durchführung	18
2.3.5.	SDS-Polyacrylamid-Disk-Gelelektrophorese	19
2.3.5.1.	Reagenzien und Geräte	19
2.3.5.2.	Durchführung	20
2.3.6.	Elektronenmikroskopie	25
2.3.6.1.	Reagenzien und Geräte	25
2.3.6.2.	Durchführung	25
2.4.	STATISTIK	26
3.	E R G E B N I S S E	27
3.1.	PROTEIN- UND LIPIDKONZENTRATIONEN IN NATIVASZITES	27

		Seite
3.1.1.	Patienten mit Adenokarzinomen des Gastrointestinaltrakts	27
3.1.2.	Patientinnen mit Ovarialkarzinomen	29
3.1.3.	Patientinnen mit Mammakarzinomen	31
3.2.	KORRELATION ZWISCHEN PROTEIN UND LIPIDEN IN NATIVASZITES	33
3.2.1.	Patienten mit Adenokarzinomen des Gastrointestinaltrakts	35
3.2.2.	Patientinnen mit Ovarialkarzinomen	37
3.2.3.	Patientinnen mit Mammakarzinomen	37
3.3.	ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER LIPOPROTEINE AUS ASZITES MALIGNER GENESE	39
3.3.1.	Gelfiltrationschromatographische Fraktionierung des Aszites	39
3.3.1.1.	Elutionsprofile	39
3.3.1.2.	Prozentuale Lipidverteilung auf die säulenchromatographisch gewonnenen Lipoproteinfraktionen	44
3.3.1.3.	Wiederfindungsrate für Lipide	46
3.3.2.	Ouchterlony-Immundiffusion	47
3.3.3.	Gradientenultrazentrifugation	51
3.3.4.	Protein- und Lipidkomposition des makromolekularen Aszteslipoproteins ALP	54
3.3.5.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	58

		Seite
3.3.5.1.	Patienten mit Adenokarzinomen des Gastrointestinaltrakts	59
3.3.5.2.	Patientinnen mit gynäkologischen Karzinomen	61
3.3.6.	Elektronenmikroskopie	63
4.	D I S K U S S I O N	65
4.1.	PATIENTENGUT	65
4.2.	METHODIK	66
4.2.1.	Aufbewahrung der Proben	66
4.2.2.	Quantitative Messung von Protein- und Lipidkomponenten	67
4.2.3.	Gelfiltrationschromatographie	68
4.2.4.	Ouchterlony-Immundiffusion	68
4.2.5.	Gradientenultrazentrifugation	69
4.2.6.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	70
4.2.7.	Elektronenmikroskopie	70
4.3.	ERGEBNISSE	71
4.3.1.	Erscheinungsform der Aszites-lipide	71
4.3.2.	Charakterisierung der Aszites-lipoproteine und ihre Karzinomspezifität	72

		Seite
4.3.3.	Mögliche Herkunft der Aszitesliproteine	75
4.3.4.	Ausblick	78
5.	Z U S A M M E N F A S S U N G	79
6.	L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	83

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

ALP	-	makromolekulares Aszites-Lipoprotein
Cpm	-	counts per minute = Impulse pro Minute
D	-	Dalton
$E_{280\ nm}$	-	Extinktion bei 280 nm
F.I.G.O.	-	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
HDL	-	High Density Lipoproteine
I.U.A.C.	-	International Union Against Cancer
LDL	-	Low Density Lipoproteine
Lsg.	-	Lösung
LSP	-	Liver Specific Lipoprotein
MG	-	Molekulargewicht
Mill.	-	Million
PAGE	-	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
R_f	-	relative Beweglichkeit
ρ	-	Dichte
Upm	-	Umdrehungen pro Minute
Vergr.	-	Vergrößerung
VLDL	-	Very Low Density Lipoproteine
v.u.n.o.	-	von unten nach oben

1. EINLEITUNG

1.1 LITERATUROBERSICHT

Bereits vor über hundert Jahren wurden Untersuchungen zur biochemischen Zusammensetzung von Peritonealergüssen durchgeführt. Unter besonderer Berücksichtigung des Eiweißgehalts und des spezifischen Gewichts gewann man grundlegende Erkenntnisse über Ex- und Transsudate (Hoffmann, F.A., 1879; Reuss, A., 1879 und 1881; Runeberg, J.W., 1884). Der Proteingehalt von Exsudaten war größer als der von Transsudaten, wobei sich zur Unterscheidung eine Grenze von 2,5 g/dl bewährt hat. Einige Autoren postulierten für Transsudate einen benignen, für Exsudate einen malignen Entstehungsmodus (Paddock, F.K., 1940). Dies erwies sich jedoch in der Folgezeit als unhaltbar, nachdem 21 Fälle unkomplizierter Leberzirrhosen mit Proteinkonzentrationen zwischen 2,6 und 4,1 mg/100 ml Aszites beschrieben worden waren (Sampliner, R.E., Iber, F.L., 1974). Bei Patienten mit tuberkulöser Peritonitis, dekompensierter Herzinsuffizienz und Pankreasnekrose sind ähnliche Befunde bekannt (Pillay, V.K., 1963). Umgekehrt kommen niedrigere Proteinkonzentrationen gelegentlich auch bei malignen Neoplasien vor (Tavel, M.E., 1959).

Viel weniger Berücksichtigung fanden Lipidbestimmungen im Aszites. Obwohl fast ebenso lange durchge-

führt wie die quantitative Messung von Protein, wurde ihnen nur geringe Bedeutung beigemessen. Erst eine in neuester Zeit fertiggestellte Arbeit hob den diagnostischen Wert der Cholesterinbestimmung im Aszites zur Unterscheidung zwischen potentiell malignen und benignen Grundleiden hervor (Martin, R., 1983). Eine Grenzkonzentration von 50 mg/100 ml Cholesterin im Aszites war geeignet, zwischen den Gruppen der benignen (<50 mg/dl) und der malignen Erkrankungen (>50 mg/dl) zu differenzieren. Für diesen Grenzwert lag die Sensitivität einer Cholesterinbestimmung bei 96%, die Spezifität bei 94%. Alle anderen biochemischen Parameter wie Protein-, Triglyzerid- oder Phospholipidgehalt besaßen keine vergleichbar gute Diskriminationsfähigkeit. Auch die Ergußzytologie, die annähernd 100%ig spezifisch ist, konnte mit einer Sensitivität von nur 58% bei weitem nicht so viele Peritonealergüsse maligner Genese auch als solche erkennen wie dies durch die quantitative Bestimmung des Cholesterintiters möglich war. Einschränkungen ergaben sich durch in der BRD seltenere entzündliche peritoneale Affektionen und suprahepatische venöse Hypertension, da bei diesen auch hohe Cholesterinspiegel beobachtet wurden.

Eine brasilianische Arbeitsgruppe fand eine positive Korrelation zwischen Protein- und Cholesteringehalt im Aszites unterschiedlichster Genese (Polak, M. et al., 1978), die jedoch von anderer Seite nicht bestätigt wurde. Gemeinsam mit gelfiltrationschromatographischen Untersuchungen, bei denen eine aus Aszites isolierte stark zusammenhaftende Triglyzerid-Proteinverbindung nur durch hohe Konzentrationen Na-

triumdodecylsulfat (SDS) gespalten werden konnte (Suzuki, N. et al., 1980), sind diese Ergebnisse Hinweise für das Vorkommen von an Protein gebundenen Lipiden. So konnten alle drei vom Plasma her bekannten Dichtegruppen von Lipoproteinen auch in den Peritonealergüssen von zwei Patientinnen mit Ovarialkarzinomen gefunden werden. Sie zeichneten sich durch einen hohen Triglyzeridgehalt aus und ähnelten darin Lymphlipoproteinen (Malmendier, C.L. et al., 1977). Zusätzliche elektrophoretische Obereinstimmungen gaben Anlaß zu der Vermutung, die Aszitesliposproteine stammten wahrscheinlich aus dem Blutplasma des Tumorträgers (Brenneman, D.E. et al., 1975). Mit dieser Theorie waren jedoch die zu den Blutanaloga teilweise erheblichen Unterschiede in Molekulargewicht, Zusammensetzung und Apoproteinen nicht erklärt (Mathur, S.N., Spector, A.A., 1976). Daher nahmen andere Autoren einen von den Stoffwechselvorgängen in Leber, Darmmukosa und Serum unabhängigen Aszitesliposproteinmetabolismus an, wenn auch eine Lipoprotein-Lipaseaktivität in Peritonealergüssen nie nachgewiesen wurde. Die Aufnahme und Utilisation von Very Low Density Lipoproteinen (VLDL) und Fettsäuren durch Ehrlich Aszitestumorzellen wiesen zumindest auf einen Flüssigkeitseinstrom in die Tumorzelle hin (Malmendier, C.L. et al., 1977). Umgekehrt konnten im Tierexperiment HDL-Apoprotein-Lezithinkomplexe die Freisetzung von Cholesterin durch die Tumorzelle in das umgebende Medium erhöhen (Jackson, R.L., Gotto, A.M.,1975). Manche Gehirntumoren waren sogar in der Lage, die Phospholipidsynthese im Vergleich zur Aktivität in normalem Gewebe zu steigern (Weiss, J.F., 1975), was auf verstärkte Neusynthese hindeutet.

Wahrscheinlich sind alle beschriebenen Mechanismen für die Lipidkomposition im Aszites mitbestimmend. Inwieweit diese vorwiegend im Tierexperiment erstellten Modelle auch auf menschliche Karzinomträger übertragbar sind, ist nicht bekannt. Die geringe Zahl der mit Humanaszites durchgeführten Studien beschränkt sich meist auf die Untersuchung von Einzelfällen.

Noch größere Unklarheit herrscht bezüglich der Funktion von Asziteslipoproteinen. Verbindliche Aussagen über ihre Bedeutung im Karzinommetabolismus sind vorerst nicht möglich.

1.2. PROBLEMSTELLUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, bei Patienten mit malignen Erkrankungen und Aszites näher zu untersuchen,

1. in welcher Form Lipide und Proteine im Aszites vorliegen,

2. diese zu isolieren und mit physiko- und biochemischen Methoden zu charakterisieren sowie

3. Aussagen über ihre Herkunft zu treffen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. PATIENTENKOLLEKTIV

2.1.1. Karzinome des Gastrointestinaltrakts

Bei 10 Patienten der Studie bestanden gastrointestinale Malignome, die in den Medizinischen Kliniken I-III des Klinikums Großhadern behandelt wurden. Die Diagnosen stützten sich auf röntgenologische, sonographische, endoskopische, computertomographische, histologische und/oder zytologische Befunde. Ausnahmslos handelte es sich um Adenokarzinome mit unterschiedlich ausgedehnter peritonealer Aussaat und Aszites. Lebermetastasen waren die Regel. In 2 Fällen konnte der zunächst unbekannte Primärtumor durch Sektion eruiert werden. Weitere Informationen über das Patientenkollektiv gibt Tab. 1.

Der Aszites wurde vor Beginn einer Chemotherapie gewonnen. Besondere Diätvorschriften wurden nicht beachtet.

Tabelle 1: Patienten mit gastrointestinalen Karzinomen

Nr.	Name	Alter	Geschlecht	Primärtumor	erhaltene Aszitesmenge
1	E.F.	59 Jahre	männlich	Magenkarzinom	1200 ml
2	H.G.	41 Jahre	weiblich	Pankreaskopfkarzinom	560 ml
3	S.J.	74 Jahre	männlich	Magenkarzinom	680 ml
4	O.S.	69 Jahre	weiblich	Gallenblasenkarzinom	900 ml
5	R.M.	47 Jahre	weiblich	Gallenblasenkarzinom	800 ml
6	S.H.	48 Jahre	männlich	Magenkarzinom	550 ml
7	K.F.	51 Jahre	männlich	Pankreaskarzinom	720 ml
8	W.E.	68 Jahre	männlich	Pankreaskarzinom	840 ml
9	P.M.	72 Jahre	weiblich	Gallenblasenkarzinom	1100 ml
10	S.E.	60 Jahre	männlich	Magenkarzinom	480 ml

2.1.2. Gynäkologische Karzinome

Patientinnen der Frauenklinik des Klinikums Großhadern im Alter von 38 bis 72 Jahren mit malignen gynäkologischen Tumoren fanden Berücksichtigung in der Studie. Die Diagnosen wurden durch gynäkologische, röntgenologische, szintigraphische, laparoskopische, mammographische, computertomographische, histologische und/oder zytologische Untersuchungen gestellt. Punktate von unter Chemotherapie stehenden Patientinnen waren von der Bearbeitung ausgeschlossen.

2.1.2.1. Ovarialkarzinome

Bei den 10 untersuchten Ovarialkarzinomen unterschiedlicher Histologie und Differenzierung handelte es sich durchwegs um Tumoren der klinischen Stadien III und IV (F.I.G.O.) mit intraperitonealer Metastasierung bzw. Fernmetastasen außerhalb der Peritonealhöhle.

2.1.2.2. Mammakarzinome

Es wurden 10 Mammakarzinome verschiedener histologischer Formen und Differenzierungsgrade untersucht. Die Tumoren gehörten ausnahmslos den Stadien $T_3N_1M_{1a}$ bis $T_4N_3M_{1b}$ (I.U.A.C.) an.

2.2. VORBEREITUNG DES PROBENMATERIALS

Mit der Aufbereitung der Aszitespunktate bei 4 °C wurde unmittelbar nach der Punktion begonnen. Peritonealergüsse mit makroskopisch erkennbarer Blutbeimengung (>0,5 - 1,0 ml Blut/l Aszites) wurden verworfen, um durch Einbluten hervorgerufene Kontaminationen mit Serumbestandteilen zu vermeiden. Eine Filtration über ein Faltenfilter (Nr. 1117 1/2, Schleicher-Schüll) diente der Abtrennung von zelligen Bestandteilen und Fibringerinnseln.

Zur Vermeidung von Bakterienwachstum wurden 0,2 mg Natriumazid (NaN_3) und 0,05 mmol Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) pro 100 ml Aszites zugegeben. Um die für die Immundiffusion, Gradientenultrazentrifugation, Elektronenmikroskopie und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese notwendigen Konzentrationen zu erreichen, wurden Teile der Aszitesflüssigkeit in einer 400 ml-Rührzelle (Amicon) über eine PM 10-Membran auf etwa 1/10 der Ausgangsmenge eingeengt.

Gelchromatographisch aufgetrennte Einzelfraktionen wurden in NaCl-EDTA-Puffer portioniert und bei 4 °C aufbewahrt.

2.3. METHODIK

2.3.1. Quantifizierung des Protein-, Cholesterin-, Triglyzerid- und Phospholipidgehalts

2.3.1.1. Reagenzien und Geräte

- Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz, Fa. Merck, Darmstadt
- Test-Combination-Cholesterin, Fa. Boehringer, Mannheim
- Test-Combination-Triglyzeride, Fa. Boehringer, Mannheim
- Perhydrol p.a., Fa. Merck, Darmstadt
- Ammoniumheptamolybdat, Fa. Merck, Darmstadt
- 1-amino-2-hydroxynaphtaleinsulfonsäure, Fa. Merck, Darmstadt
- Natriumdisulfit, Fa. Merck, Darmstadt
- Natriumsulfit, Fa. Merck, Darmstadt

Fiske-Subbarow

- Natriumammoniumhydrogenphosphat, Fa. Merck, Darmstadt
- Precilip E.L., Fa. Boehringer, Mannheim
- Jod p.a., doppelt sublimiert, Fa. Merck, Darmstadt
- Ninhydrin-Sprühreagenz, Fa. Merck, Darmstadt
- Molybdatophosphorsäure-Sprühreagenz 3,5 %, Fa. Merck, Darmstadt
- Wismut-III-nitrat, Fa. Merck, Darmstadt
- Kaliumjodid, Fa. Merck, Darmstadt
- L(+)-Weinsäure, Krist. reinst, Fa. Merck, Darmstadt

- Präzisionsküvetten aus Quarzglas, Fa. Hellma, Müllheim

- Spectralphotometer Model 24, Fa. Beckman Instruments Inc., Fullerton, Ca., USA
- DC-Fertigplatten, Kieselgel 60F-254, Fa. Merck, Darmstadt

2.3.1.2. **Proteinbestimmung**

Die Eiweißbestimmung erfolgte nach Fällung mit Trichloressigsäure und Auflösung des Sediments in 1n NaOH photometrisch mit dem Folin-Reagenz. Rinderserumalbumin diente als Standard (Lowry, O.H. et al., 1951).

2.3.1.3. **Cholesterinbestimmung**

Zur Ermittlung der Gesamtcholesterinkonzentration wurde ein enzymatischer Test nach der CHOD-PAP-Methode herangezogen, bei der ein spektralphotometrisch meßbarer Farbkomplex entsteht (Röschlau, P. et al., 1975). Zur Kontrolle der Richtigkeit wurde ein Lipidstandard mitgeführt.

2.3.1.4. **Triglyzeridbestimmung**

Nach Verseifung der Neutralfette mit 0,5 mol/l äthanolischer KOH wird das entstandene Glyzerin enzymatisch in Lactat übergeführt. Dabei wird die Abnahme von $NADH_2$ photometrisch verfolgt (Eggstein, M., 1966). Die Richtigkeitskontrolle erfolgte mittels Precilip E.L.

2.3.1.5. **Phospholipidbestimmung**

2.3.1.5.1. Gesamtphospholipide

Vor der quantitativen Messung wird 0,1 ml Probe mit 1,0 ml Aqua bidest. versetzt und mit 8 ml Chloroform/Methanol (3:1, v/v) extrahiert. Nach Absaugen der wäßrigen Phase werden 5 ml der Chloroformphase entnommen und mit N_2 getrocknet (Folch, J., 1956).
Das folgende kolorimetrische Nachweisverfahren für Phosphor bei 830 nm beruht auf der Bildung eines Farbkomplexes durch das Fiske-Subbarow-Reagenz in Anwesenheit von 10 n Schwefelsäure, Perhydrol und Ammoniumheptamolybdat (Fiske, C.H., Subbarow, Y., 1925).
Die Konzentrationsberechnung erfolgte durch den Vergleich der Extinktion mit einer Standardkurve. Ein Lipidkontrollserum diente der Überprüfung der Richtigkeit.

2.3.1.5.2. Quantitative dünnschichtchromatographische Auftrennung in Einzelkomponenten

Zur dünnschichtchromatographischen Auftrennung der Phospholipide wurden 20 x 20 cm Kieselgelplatten der Dicke 0,25 mm mit Wasser als stationärer Phase herangezogen. Der eindimensionale Lauf der mit Chloroform/Methanol im Mischungsverhältnis 2:1 extrahierten Fraktionen erfolgte mit dem Fließmittel Chloroform/Methanol/Ammoniak (13:5:1) als mobile Phase.

Die aufgetrennten Komponenten wurden in der Jodkammer sichtbar gemacht und mit aus Weinsäure, basischem Wismut-Subnitrat and Kaliumjodid hergestelltem Dragendorff-Reagenz und Ninhydrin weiter identifiziert (Hölzel, J., 1976). Zusätzlich wurden Cardiolipin, Phosphatidylcholin, Sphingomyelin, Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylserin als Referenzsubstanzen mitgeführt und mit Molybdatophosphorsäure angefärbt.
Nach Abnehmen der einzelnen Fraktionen mit einem Spatel erfolgte eine erneute Extraktion in 3 ml Chloroform/Methanol (2:1), woran sich die unter 2.3.1.5.1. beschriebene quantitative Phosphorbestimmung anschloß.

2.3.2. Gelfiltrationschromatographische Fraktionierung des Aszites

2.3.2.1. Reagenzien und Geräte

- Sephadex G 100, 40-120 µ, Fa. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden
- Biogel A-5m, 100-200 mesh, Fa. Bio-Rad Laboratories, München
- (1,2-^{3}H(N))-Cholesterol Net. 139, Fa. New England Nuclear, Boston, Mass., USA
- Szintillationsmischung, Fa. Röth, Karlsruhe
- Äthylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz, Fa. Merck, Darmstadt
- Phenylmethansulfonylfluorid, Fa. Merck, Darmstadt

- Natriumazid, Fa. Merck, Darmstadt

- Glassäule, 100 cm Länge, 2,5 cm Innendurchmesser, Fa. Bender und Hobein, München
- Glassäule, 120 cm Länge, 1,8 cm Innendurchmesser, Fa. Bender und Hobein, München
- Fraktionskollektor 730 - 007, Fa. Instrumentation Specialties Company, Lincoln, Nebraska, USA
- Taumler 54132, Fa. Heidolph, Kehlheim
- Spectralphotometer Model 24, Fa. Beckman Instruments Inc., Fullerton, Ca., USA
- Präzisionsküvetten aus Quarzglas, Fa. Hellma, Müllheim
- Betaszint BF 5000, Fa. BF-Vertriebs-GmbH, München
- Zählröhrchen, Fa. W. Zinsser, Frankfurt
- Kollodiumhülsenhaltevorrichtung SM 16304, Fa. Sartorius-Membranfilter GmbH, Göttingen
- Kollodiumhülsen SM 13200, Fa. Sartorius-Membranfilter GmbH, Göttingen

2.3.2.2. Durchführung

Das mit 0,15 mol/l NaCl, 0,1 g/l Na_2-EDTA, 0,2 g/l Natriumazid und 0,5 mmol/l PMSF enthaltender Elutionslösung (Sata, D. et al., 1972) hydratisierte und entgaste Polydextrangelmaterial wurde bei 4 °C unter Beachtung des maximal zulässigen hydrostatischen Druckes luftblasenfrei in die gewünschte Glassäule gefüllt. Nach 8-stündiger Stabilisierung und Spülung mit dem 3-fachen Säulenvolumen wurde die Geloberfläche zum Schutz vor Verunreinigungen mit einem Filterpapier bedeckt.

Das Ausschlußvolumen wurde mittels Serum-Very Low Density Lipoproteinen bekannten Molekulargewichts (MG 3- 130 Mill. D) bestimmt.

Vor der Auftragung wurden 4 ml der nach vorstehender Beschreibung (2.2.) vorbereiteten Proben zur radioaktiven Markierung mit 0,4 µCi äthanolischem ^{3}H-Cholesterin, das sich mit dem physiologischerweise enthaltenen austauscht, 2 bis 3 Stunden im Taumler bei 20 °C inkubiert (Foreman, J.R. et al., 1977). Im Anschluß daran folgte eine vorreinigende Gelfiltration über eine 100 cm lange Sephadex G-100 Säule mit 2,5 cm Innendurchmesser. Die maximal applizierte Konzentration überschritt niemals 72 mg Protein/ml. Die Flußrate betrug weniger als 16 ml/h, wobei ein hydrostatischer Druck von 35 cm H_2O als obere Grenze galt.

Es wurden 70 - 80 Fraktionen zu je 8 ml gesammelt und die Extinktion bei 280 nm spektralphotometrisch gemessen. Von 0,1 ml je Fraktion wurden nach Zugabe von 5 ml Bray-Szintillationslösung die vom ^{3}H-Cholesterin abgegebenen Impulse/min im Betaszint 5000 gezählt. Die Aktivität enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt und mit der Vakuumpumpe und dem Sartorius-Membranfiltergerät über Kollodiumhülsen auf etwa 3 - 5 ml eingeengt. Diese wurden zur nachfolgenden fein trennenden Rechromatographie auf eine 120 cm lange Biogel A-5 m Säule mit 1,8 cm Innendurchmesser aufgetragen und unter den gleichen oben genannten Bedingungen eluiert. Wiederum wurden etwa 60 Fraktionen à 8 ml gesammelt, in denen die Extinktion bei 280 nm und die pro Minute ausgesendeten Impulse der beta-Strahlung gemessen wurden.

Die graphische Darstellung des ^{3}H-Cholesteringehalts der einzelnen Fraktionen ergab 3 Peaks, die über Kollodiumhülsen auf je 1 - 2 ml eingeengt wurden. Sie waren das Ausgangsmaterial für die weitere Analytik.

2.3.3. Immundiffusion nach Ouchterlony

2.3.3.1. Reagenzien und Geräte

- 5,5-Diäthylbarbitursäure Natriumsalz z.A., Fa. Merck, Darmstadt
- Bacto-Agar, Fa. Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
- Agarose Standard Low-m_r, Fa. Biorad Laboratories, München
- Amidoschwarz-10B, Fa. Sigma, München
- Ölrot O, Fa. Sigma, München
- Antiserum gegen Human-Apolipoprotein A, Fa. Behring, Marburg
- Antiserum gegen Human-Apolipoprotein B, Fa. Behring, Marburg
- Antiserum gegen Humanserum, Fa. Behring, Marburg
- Antiserum gegen Humanalbumin, Fa. Behring, Marburg

- 6-fach-Stanze für Ouchterlony, Fa. Boskamp GmbH, Hersel/Bonn

2.3.3.2. **Durchführung**

Zur Charakterisierung der isolierten Fraktionen wurde eine radiale doppelte Immundiffusion (Ouchterlony, D., 1969) in 2%-igem Bacto-Agar und 1%-igem Agarose-Agar mit und ohne Zusatz von 1% SDS durchgeführt. Die bei 20 °C in der feuchten Kammer gebildeten Präzipitationslinien wurden nach 24 bis 48 Stunden im Dunkelfeld ausgewertet. Die Färbung der Lipoproteine erfolgte nach 12-stündigem Einlegen in 0,98%-ige Kochsalzlösung mit Amidoschwarz-10B und Ölrot O (Lamerz, R., Fateh-Moghadam, A., 1969).

Getestet wurde gegen industriell hergestellte Antiseren, die durch Immunisierung mit alpha$_1$-Lipoproteinen, beta-Lipoproteinen, Albumin und Humanvollserum gewonnen worden waren. Antikörper gegen Lipoproteine von Leberzellen (Liver Specific Lipoprotein LSP) wurden von Frau U. Behrens, Immunopathology Laboratory, Veterans Administration Medical Center, Bronx, New York, zur Verfügung gestellt.

Das LSP-Antiserum war durch wiederholte Injektion von durch doppelte Gelfiltration (Sephadex G-100 und Sepharose 6B) gereinigtem und in einer Öl/Wasser-Suspension von Freud'schem Adjuvans aufgenommenem LSP aus dem 100000g-Oberstand menschlichen Leberhomogenisats in Kaninchen hergestellt worden. Die Absorption der Antiseren war mit lyophilisiertem Humanplasma und Gewebsextrakten aus Niere, Milz, Lunge und Muskel 30 min bei 37 °C durchgeführt und 2 bis 3 mal wiederholt worden (Behrens, U., Paronetto, F.,

1979). Die Organspezifität wurde durch doppelte Immundiffusion geprüft (Mc Farlane, I.G. et al., 1977).

2.3.4. Gradientenultrazentrifugation

2.3.4.1. Reagenzien und Geräte

- Cäsiumchlorid, Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg

- Ultrazentrifuge, Fa. Beckman Instruments Inc., Fullerton, Ca., USA
- Rotor SW 60, Fa. Beckman Instruments Inc., Fullerton, Ca., USA
- Cellulose-Nitrat-Zentrifugenröhrchen, Fa. Beckman Instruments Inc., Fullerton, Ca., USA

2.3.4.2. Durchführung

Nach Einbringen von 0,5 ml Probe in ca. 4 ml optisch reiner CsCl-Lösung der Dichte 1,070 g/ml wurde die Gradientenultrazentrifugation 72 Std. lang in einem Beckman SW 60-Ausschwingrotor bei 50000 Upm (≙ 256 500 g in Röhrchenmitte) durchgeführt. Während des Laufs wurden eine konstante Temperatur von 4 °C und ein Vakuum von 133,3 - 266,6 kPa aufrechterhalten (Griffith, O.M., 1976).
Nach Beendigung der Zentrifugation wurden 11 Fraktionen zu je 0,4 ml entnommen, deren Dichte durch

Wiegen eines Aliquots von 0,2 ml berechnet wurde. Anschließend wurde ihre Extinktion bei 280 nm gemessen und der ^{3}H-Cholesteringehalt bestimmt und mit der Höhe der gelegentlich bereits makroskopisch sichtbaren Bande in Beziehung gesetzt.

2.3.5. SDS-Polyacrylamid-Disk-Gelelektrophorese

2.3.5.1. Reagenzien und Geräte

- Acrylamid, Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- N,N'-Methylen-bisacrylamid, Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (TEMED), Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- Natriumdodecylsulfat (SDS), Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- Serva Blau R, Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- Ammoniumpersulfat, Fa. Bio-Rad Laboratories, München
- Glyzin, Fa. Bio-Rad Laboratories, München
- 2-Merkaptoäthanol, Fa. Merck-Schuchard, Hohenbrunn bei München
- Glyzerin, Zentralapotheke des Klinikums Großhadern
- Elektrophoresen-Kalibrierungs-Satz (MG 14400 - 94000), Fa. Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg

- Havanna Trenneinheit, Fa. Desaga GmbH & Co., Heidelberg
- Netzanschlußgerät, Fa. Desaga GmbH & Co., Heidelberg

- Doppeltrennzelle, Fa. Desaga GmbH & Co., Heidelberg
- Blindzelle, Fa. Desaga GmbH & Co., Heidelberg
- Polymerisationsständer, Fa. Desaga GmbH & Co., Heidelberg
- Profilformer, Fa. Desaga GmbH & Co., Heidelberg
- Kühlmaschine, Fa. Colora Meßtechnik GmbH, Lorch, Württ.
- Eppendorf Thermostat 5320, Fa. Netheler & Hinz GmbH, Karlsruhe
- Eppendorf Zentrifuge 3200, Fa. Netheler & Hinz GmbH, Karlsruhe
- Magnetrührer IKA-Combimag RCO, Fa. Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau

2.3.5.2. **Durchführung**

Die 2 gereinigten und mit Aceton entfetteten Glasplatten der Doppeltrennzelle wurden an Rändern und Mittelsteg mit Vaseline bestrichen und mittels Kunststoffschrauben zusammengefügt. Für den luftdichten Verschluß der unteren Öffnung sorgte ein Parafilmstreifen. Dann konnten Trennzelle und zugehörige Blindzelle in den Polymerisationsständer gespannt werden.

In einem kleinen Becherglas wurden die Lösungen für das Trenngel (Tab. 3) nach dem Schema in Tab. 2 zusammenpipettiert, wobei das die Polymerisation einleitende APS als letzte Komponente zuzugeben war.

Tabelle 2: Pipettierschema zur Herstellung von Polyacrylamidgelen mit C = 2,6 %

	Trenngel T = 10% (ml)	Konzentrierungsgel T = 3% (ml)
Acrylamid-Bisacrylamid-Lsg.	13,320	3,000
SDS-Lösung	0,400	0,300
TEMED	0,020	0,015
H_2O	21,060	22,620
APS-Lösung	0,200	0,300

Nach guter Durchmischung mit einem Glasstab wurde das Gel in beide Trennkompartimente bis ca. 1,5 cm unter den oberen Rand luftblasenfrei eingefüllt und sogleich mittels einer Pasteur-Pipette mit Aqua bidest. überschichtet. Nach etwa 1 Std. war das Trenngel polymerisiert und schloß mit einer geraden Linie ab, auf die das Konzentrierungsgel gesetzt werden konnte.
Die Trennzellen wurden bis 2 mm unter den Rand mit Konzentrierungsgel (Tab. 2 und 3) gefüllt. Dann wurde der Profilformer zur Herstellung der 24 Geltaschen für die Probenauftragung luftblasenfrei eingesetzt. Dieses Gel benötigte ca. 80 min für die Polymerisation.
Maximal konnten 200 µl pro Geltasche eingebracht werden. Die gewünschte Probe wurde in Eppendorfgefäßen im Verhältnis 1:4 mit Probenpuffer (Tab. 3) verdünnt, der neben TRIS und SDS Glyzerin enthielt, welches das Herabsinken der Probenlösung auf den Grund der Geltasche erleichtern sollte. 2-Merkaptoäthanol entfaltet durch Reduktion der Disulfidbrücken eine dissoziierende Wirkung. SDS gestattet durch Einführung einer stark negativen Ladung die Trennung der Polypeptide nach dem Molekulargewicht.

Als Referenzsubstanzen wurde ein Gemisch aus 6 Markerproteinen mit genau definiertem Molekulargewicht und ultrazentrifugiell gewonnene und säulenchromatographisch gereinigte Serumlipoproteine herangezogen (Lindgren, F.T. et al., 1972).
Marker und Proben wurden 5 - 10 min auf 100 °C erhitzt und anschließend 2 min bei 2000 Upm zentrifugiert, um die Gelmatrix nicht durch ausgefallene Lipide zu beschädigen.

Die Auftragung erfolgte in der bereits mit Elektrodenpuffer (Tab. 3) gefüllten Trenneinheit mit Eppendorf-Pipetten, in deren Spitze unterhalb des Probenvolumens eine Luftblase aufgezogen wurde, um eine Durchmischung mit dem Puffer zu vermeiden.
Bei 180 V und 0,25 A betrug die Laufzeit 200 min. Mittels eines Kryostaten wurde eine konstante Temperatur von 20 °C aufrechterhalten. Eine Pumpe sorgte für Umwälzung des Elektrodenpuffers.
Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel 1 Std. lang mit Coomassieblau R 250 (Tab. 3) gefärbt und über Nacht unter dauerndem Rühren auf dem Magnetrührer entfärbt (Tab. 3). Zur Dokumentation erfolgte eine Konservierung mit Glyzerin (Tab. 3).

Tabelle 3: Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Disk-Gelelektrophorese (modifiziert nach J. Zähringer)

Probenpuffer pH 6,8 (5-fach konzentriert)	755 mg 2 g 10 ml 5 ml	Tris SDS Glyzerin 2-Mercaptoäthanol	ad 20 ml H_2O
Acrylamid-Bisacrylamid-Lsg. C = 2,6%	30 g 0,8 g	Acrylamid N,N'-Methylenbisacrylamid	ad 100 ml H_2O
SDS-Lösung	1 g	Natriumdodecylsulfat	ad 10 ml H_2O
Ammoniumpersulfatlösung (APS)	1 g	APS	ad 10 ml H_2O
Trenngelpuffer pH 6,7	36,3 g 48,0 ml	Tris 1n HCl	ad 100 ml H_2O
Konzentrierungsgelpuffer pH 6,7	25,6 ml 5,98 g	1m H_3PO_4 Tris	ad 100 ml H_2O
Elektrodenpuffer pH 8,3 (5-fach konzentriert)	37,5 g 180 g 25 g	Tris Glyzerin SDS	ad 5 l H_2O
Proteinfärbelösung	0,14 g 7 ml	Servablau R Eisessig	ad 100 ml Methanol/H_2O (1:1)
Entfärbelösung	50 ml 70 ml	Methanol Eisessig	ad 1 l H_2O
Konservierungslösung	350 ml 1,5 ml	Methanol Glyzerin	ad 500 ml H_2O

2.3.6. Elektronenmikroskopie

2.3.6.1. Reagenzien und Geräte

- Wolframatophosphorsäure, Fa. Merck, Darmstadt

- Elektronenmikroskop Typ 101, Fa. Siemens, Erlangen
- Polaron G-400 Kupfernetzchen mit 0,5 % Polyvinylformal, Fa. VeCo, Solingen
- Uhrmacherpinzette mit gebogener Spitze, Fa. Bender und Hobein, München
- Filterpapier, Fa. Bender und Hobein, München

2.3.6.2. Durchführung

Die Elektronenmikroskopie wurde im Institut für Diabetesforschung München, Abteilung Elektronenmikroskopie, mit einem Elektronenmikroskop des Typs Siemens 101 bei einer Spannung von 80 kV und einer Vergrößerung von 1:100000 durchgeführt.
Mit Kohle bedampfte und beglimmte Kupfernetzchen mit 0,5 %iger Formvarbeschichtung wurden 30 - 60s mit Probe und danach weitere 30 - 60s mit 2%iger mittels KOH auf pH 7,0 eingestellter Phosphorwolframsäure benetzt. Nach vorsichtigem Abtupfen überschüssiger Flüssigkeit mit dünnem Filterpapier konnte die Probe zur Untersuchung herangezogen werden.

2.4. STATISTIK

Ein Kollektiv von 30 Patienten liefert statistisch auswertbare Resultate.
Da über die Verteilung der Meßwerte zu wenig bekannt war, wurde der Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient (r) der Absolutwerte mit dem Spearman-Korrelationskoeffizienten (r_s) der nach steigender Höhe geordneten Ränge überprüft. Dieser setzt im Gegensatz zu ersterem keine normalverteilten Daten voraus. Er mußte mindestens $\pm$ 0,552 betragen, um bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p = 0,05 bei zweiseitiger Testung für 10 Fälle nicht zufallsbedingt zu sein. Aus den gleichen Gründen wurden auch Standardnormalverteilung und Mittelwert durch Spannweite B und Median $\tilde{x}$ ersetzt.

3. ERGEBNISSE

3.1. PROTEIN- UND LIPIDKONZENTRATIONEN IN NATIVASZITES

3.1.1. Patienten mit Adenokarzinomen des Gastrointestinaltrakts

Von Nativaszites 4 weiblicher und 6 männlicher Patienten mit Adenokarzinomen des Gastrointestinaltrakts wurden quantitative Protein- und Lipidbestimmungen durchgeführt.
Der Eiweißgehalt schwankte von 1,2 bis 7,4 g/100 ml. Die auf Medianbasis errechnete mittlere Konzentration betrug 3,4 g/100 ml. Die Gesamtcholesterinwerte reichten von 26,10 bis 139,20 mg/100 ml. Der Median ergab 49,04 mg/100 ml. Eine wesentlich größere Spannweite wiesen die Triglyzeridkonzentrationen auf. Während Einzelwerte von 38,05 bis 715,84 mg/100 ml gemessen wurden, gibt der Median mit 58,16 mg/100 ml die für nicht-chylöse Peritonealergüsse zutreffendere Größenordnung des Neutralfettgehalts an. Bei dem Extremwert von 715,84 mg/100 ml handelte es sich um bereits makroskopisch milchig trüben Aszites, der durch den Einbruch des Tumors in das lymphdrainierende System erklärt werden kann. Ähnliche Verhältnisse fanden sich bei den Phospholipidkonzentrationen, die in einem Bereich von 121,67 bis 658,00 mg/100 ml lagen. Bei einem Median von 351,30 mg/100 ml wurde auch hier der höchste Wert im Fall des chylösen Aszites erreicht.
Die Einzelwerte sind in Tab. 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Protein- und Lipidgehalt von Nativaszites bei Patienten mit Adenokarzinomen des Gastrointestinaltrakts

Nr.	Name	Protein (g/100 ml)	Gesamtcholesterin (mg/100 ml)	Triglyzeride (mg/100 ml)	Gesamtphospholipide (mg/100 ml)
1	E.F.	2,4	26,10	715,84	658,00
2	H.G.	7,4	139,20	56,00	508,00
3	S.J.	3,0	47,89	46,67	326,14
4	O.S.	1,2	30,25	38,05	121,67
5	R.M.	5,4	112,42	105,54	392,63
6	S.H.	3,8	50,18	105,54	376,45
7	K.F.	2,7	39,01	50,15	319,87
8	W.E.	4,3	62,18	77,81	214,75
9	P.H.	3,8	57,03	60,31	286,00
10	S.E.	1,6	47,34	53,13	402,66
Spannweite B:		1,2 - 7,4	26,10 - 139,20	38,05 - 715,84	121,67 - 658,00
Median $\tilde{x}$:		3,4	49,04	58,16	351,30

3.1.2. Patientinnen mit Ovarialkarzinomen

Keine wesentlichen Abweichungen von obigen Ergebnissen zeigte die Gruppe der Patientinnen mit Ovarialkarzinomen.
Der Proteingehalt des Aszites schwankte von 2,5 bis 5,6 g/100 ml um einen mittleren Wert von 4,4 g/100 ml. Die Gesamtcholesterinkonzentration reichte von 42,22 bis 140,76 mg/100 ml. Der Median erwies sich mit 106,62 mg/100 ml als doppelt so hoch wie der des gastroenterologischen Kollektivs. Geringgradig waren hingegen die Unterschiede bei den Triglyzeriden und Phospholipiden. Die Neutralfette lagen zwischen 30,15 und 104,11 mg/100 ml mit $\tilde{x}$ = 73,60 mg/100 ml.
Die Gesamtphospholipide schwankten von 40,76 bis 444,06 mg/100 ml. Ihr Median betrug 301,69 mg/100 ml.

Über nähere Einzelheiten gibt Tab. 5 Aufschluß.

Tabelle 5: Protein- und Lipidgehalt von Nativaszites bei Patientinnen mit Ovarialkarzinomen

Nr.	Name	Protein (g/100 ml)	Gesamtcholesterin (mg/100 ml)	Triglyzeride (mg/100 ml)	Gesamtphospholipide (mg/100 ml)
1	L.S.	3,5	77,12	36,04	391,87
2	J.M.	4,3	132,55	78,26	40,76
3	H.M.	4,5	94,61	75,39	273,46
4	F.R.	3,5	113,34	71,18	426,00
5	K.K.	4,5	99,90	55,28	329,91
6	M.B.	2,5	42,22	30,15	225,00
7	F.M.	5,0	133,63	95,49	45,66
8	D.M.	3,6	66,63	71,80	395,00
9	K.A.	4,4	131,00	76,10	444,06
10	L.E.	5,6	140,76	104,11	87,80
Spannweite B:		2,5 - 5,6	42,22 - 140,76	30,15 - 104,11	40,76 - 444,06
Median $\tilde{x}$:		4,4	106,62	73,60	301,69

3.1.3. Patientinnen mit Mammakarzinomen

Starke Ähnlichkeiten mit den beiden anderen Kollektiven fanden sich in der Gruppe der Patientinnen mit Mammakarzinomen.
Der Eiweißgehalt des Punktats betrug im Mittel 3,8 g/100 ml. Der höchste gemessene Wert lag bei 6,0 g/100 ml, der niedrigste mit 2,0 g/100 ml unter der oben erwähnten Exsudatgrenze. Die Gesamtcholesterinkonzentration reichte von 34,27 bis 214,91 mg/100 ml, der Median berechnete sich zu 81,50 mg/100 ml. Die Triglyzeridkonzentration bewegte sich in dem Bereich von 35,18 bis 124,61 mg/100 ml mit einem medianen Wert von 73,31 mg/100 ml. Die Gesamtphospholipidkonzentration erstreckte sich auf den Bereich von 40,14 bis 481,92 mg/100 ml. 286,93 mg/100 ml war der Median.

Weitere Daten finden sich in Tab. 6.

Tabelle 6: Protein- und Lipidgehalt von Nativaszites bei Patientinnen mit Mammakarzinomen

Nr.	Name	Protein (g/100 ml)	Gesamtcholesterin (mg/100 ml)	Triglyzeride (mg/100 ml)	Gesamtphospho-lipide (mg/100 ml)
1	G.L.	3,8	84,91	44,51	40,14
2	E.H.	2,0	34,27	35,18	218,26
3	S.M.	4,3	182,90	91,90	417,72
4	D.I.	3,7	65,81	74,67	280,99
5	H.B.	2,7	51,09	40,92	255,90
6	R.C.	4,2	108,12	73,81	244,53
7	F.T.	3,2	78,09	48,72	244,53
8	B.I.	6,0	214,91	124,61	481,92
9	D.T.	4,9	175,62	93,54	387,12
10	S.H.	3,5	72,03	72,81	292,87
Spannweite B:		2,0 - 6,0	34,27 - 214,91	35,18 - 124,61	40,14 - 481,92
Median $\tilde{x}$:		3,8	81,50	73,31	286,93

3.2. KORRELATION ZWISCHEN PROTEIN UND LIPIDEN IM ASZITES

Tab. 7 zeigt den Vergleich des aus Absolutwerten berechneten Produkt-Moment-Korrelationskoeffizienten (r) mit dem Spearman-Korrelationskoeffizienten (r_s) der Ränge der Einzelwerte. Die gute Übereinstimmung der Koeffizienten zeigt die Validität der Methode. Bei der Protein-Triglyzerid-Korrelation in der ersten Gruppe wurden nur 9 Werte berücksichtigt, da der Extremwert der Neutralfettkonzentration durch Übertritt von Lymphlipoproteinen in den Aszites verursacht war.

Da eine Normalverteilung der Daten nicht vorausgesetzt werden konnte, fand im Folgenden nur noch der Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient Verwendung.

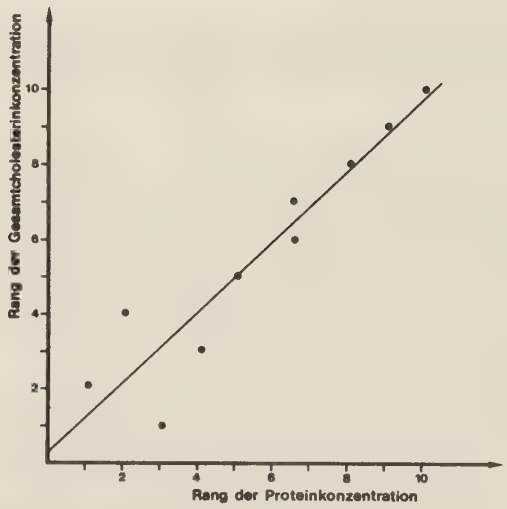
Tabelle 7: Vergleich des Produkt-Moment-Korrelationskoeffizienten (r) mit dem Spearman-Rang-Korrelationskoeffizienten (r_s), Anzahl der Paare (n)

	Gastrointestinale Karzinome			Ovarialkarzinome			Mammakarzinome		
	n	r	r_s	n	r	r_s	n	r	r_s
Protein - Gesamtcholesterin	10	0,925	0,936	10	0,825	0,701	10	0,916	0,939
Protein - Triglyzeride	9	0,439	0,736	10	0,841	0,781	10	0,924	0,903
Protein - Gesamtphospholipide	10	0,280	0,158	10	-0,476	-0,378	10	0,648	0,758

3.2.1. Patienten mit Adenokarzinomen des Gastrointestinaltrakts

In der Gruppe der Patienten mit Adenokarzinomen des Magen-Darm-Trakts ergab sich eine starke positive Korrelation (r_s = 0,936) zwischen dem Rang der Gesamtcholesterinkonzentration und dem Rang der Proteinkonzentration. Die Werte streuten um die Gerade $y = 0,94x + 0,34$ (Abb. 1a).
Schwächer, aber bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,05$ deutlich signifikant, war die Rangkorrelation zwischen Triglyzeridkonzentration und Protein (r_s = 0,736). Die hierfür berechnete Regressionsgerade ist $y = 0,74x + 1,30$ (Abb. 1b).
Die Phospholipid- und Proteinkonzentration korrelierten nicht miteinander (Tab. 7).

a.



b.

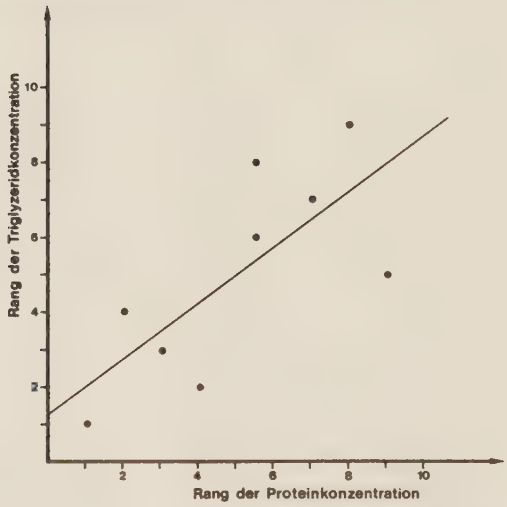


Abb. 1

Spearman-Rang-Korrelation bei Patienten mit Adenokarzinomen des Gastrointestinaltrakts

a. Gesamtcholesterin - Protein, r_s = 0,936, y = 0,94x + 0,34

b. Triglyzeride - Protein, r_s = 0,736, y = 0,74x + 1,30, n = 9

3.2.2. Patientinnen mit Ovarialkarzinomen

Die breiteste Streuung um die Regressionsgerade wurde in der Gruppe der Patientinnen mit Ovarialkarzinomen beobachtet. Der Spearman-Korrelationskoeffizient für Gesamtcholesterin und Protein lag mit r_s = 0,701 am niedrigsten, beschrieb aber noch einen signifikant (p = 0,05) positiven Zusammenhang. y = 0,71x + 1,62 kennzeichnet die durch die Punktewolke gelegte Gerade.
Eine bessere Abhängigkeit ließ sich zwischen dem Rang der Triglyzeridkonzentration und dem der Proteinkonzentration nachweisen (r_s = 0,781). Die Gleichung y = 0,79x + 1,18 charakterisiert die zugehörige Regressionsgerade.
Zwischen Phospholipiden und Protein ergab sich wiederum keine Korrelation.

3.2.3. Patientinnen mit Mammakarzinomen

Im Kollektiv der Patientinnen mit Mammakarzinomen konnte zwischen allen 3 Lipidfraktionen und dem Proteingehalt eine positive Korrelation errechnet werden.
Der Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient betrug für die Ränge von Gesamtcholesterin und Protein r_s = 0,939 (y = 0,94x + 0,33), für Triglyzeride und Protein r_s = 0,903 (y = 0,90x + 0,53) und für Gesamtphospholipide und Protein r_s = 0,758 (y = 0,76x + 1,33).

Nur in dieser Gruppe konnte auch zwischen Phospholipiden und Proteinen eine signifikante Abhängigkeit gefunden werden.

Die bei allen untersuchten Karzinompatienten positive Korrelation zwischen Protein- und Lipidkomponenten könnte auf das Vorliegen von Lipid-Proteinkomplexen hindeuten, deren Eiweiß- und Lipidkomponenten wie in Lipoproteinen zueinander in relativ fester Beziehung stehen.

3.3. ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER LIPOPROTEINE AUS ASZITES MALIGNER GENESE

3.3.1. Gelfiltrationschromatographische Fraktionierung des Aszites

3.3.1.1. Elutionsprofile

Mit Hilfe einer Sephadex G 100-Säule gelang es bei allen Aszitespunktaten, die proteingebundenen Lipide (1. Peak) weitgehend von den Proteinen mit niedrigem Molekulargewicht (2. Peak) zu trennen. Die Eichung der Säule erfolgte mit 3 ml Normalserum, das mit 0,2 µCi/ml ^{3}H-Cholesterin markiert worden war (Abb. 2).

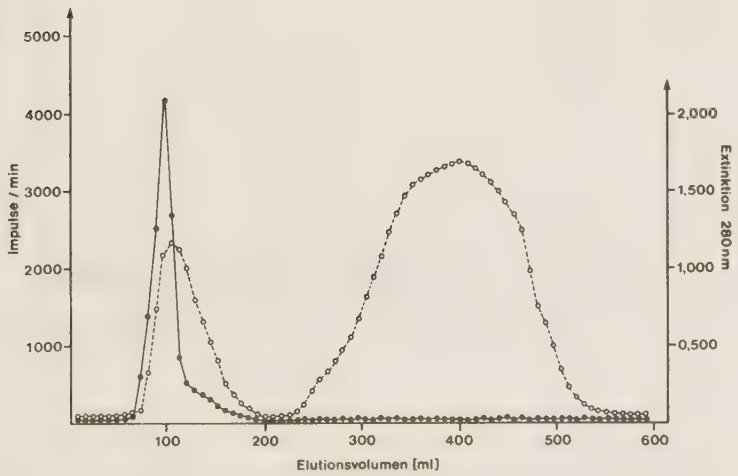


Abb. 2
Eichkurve der Sephadex G 100-Säule mit Normalserum
•—• ^{3}H-Cholesterin-Impulse pro Minute
o---o Extinktion bei 280 nm

Ein entsprechendes Elutionsprofil ergab die Gelfiltration von radioaktiv markiertem Nativaszites (Abb. 3). Während im ersten in Abb. 3 sichtbaren Peak (Fraktion 9 - 15) die von dem ^{3}H-Cholesterin ausgesendeten Impulse mit einer deutlichen Zunahme der Extinktion bei 280 nm zusammenfielen, konnten in späteren Fraktionen (39 - 69) nur noch hohe Extinktionen und keinerlei radioaktive Strahlung mehr gemessen werden.

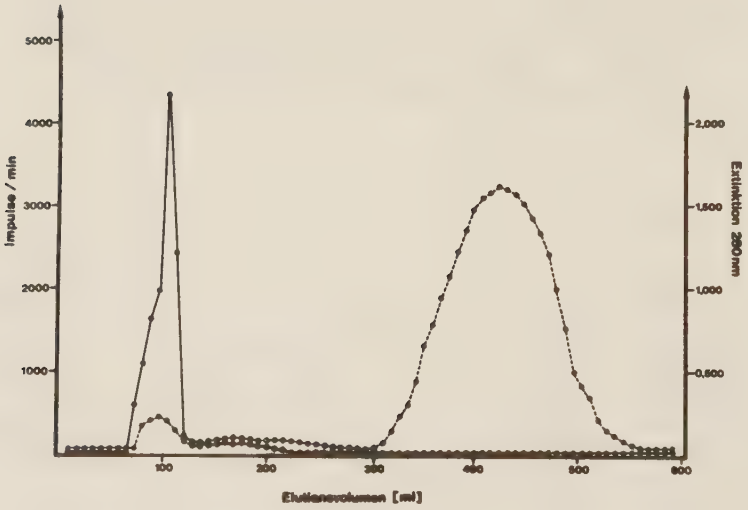


Abb. 3
Elutionsprofil von Nativaszites auf Sephadex G 100
●——● ^{3}H-Cholesterin-Impulse pro Minute
o---o Extinktion bei 280 nm

Bevor der zusammengefaßte und auf 4 ml eingeengte Lipid-Proteinpeak zur weiteren Fraktionierung auf eine Biogel A-5m-Säule aufgetragen wurde, wurde diese mit ultrazentrifugiell gewonnenen Serumlipoproteinen bekannten Molekulargewichts (Gofman, J.W., 1949) geeicht (Abb. 4).

Very Low Density Lipoproteine (VLDL) eluierten im Ausschlußvolumen in Fraktion 14 - 17, Low Density Lipoproteine (LDL) in Fraktion 18 - 25 und High Density Lipoproteine (HDL) in Fraktion 26 - 35. Geringfügige Oberlappungen gab es vor allem zwischen LDL und HDL, wenn die Säule überladen war.

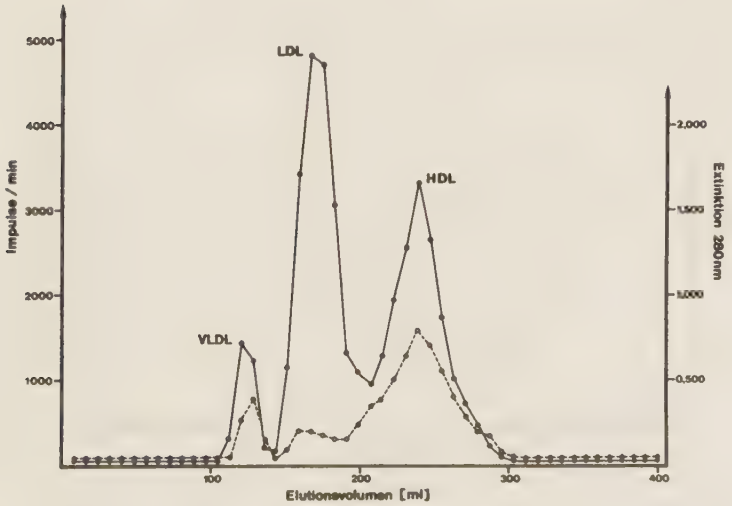


Abb. 4

Eichkurve der Biogel A-5m-Säule mit Serumlipoproteinen

●——● ^{3}H-Cholesterin-Impulse pro Minute

o---o Extinktion bei 280 nm

Auch das Elutionsprofil der Asziteslipid-Protein-fraktion zeigte drei gut voneinander abgegrenzte, den Serumlipoproteinen ähnliche Peaks, wobei der zweite im LDL-Molekulargewichtsbereich immer die meisten Impulse pro Minute aufwies.
Bei den Adenokarzinomen des Gastrointestinaltrakts überragte der erste Peak bei szintigraphischer Messung häufig den dritten (Abb. 5a), bei beiden Gruppen gynäkologischer Karzinome war oft das Gegenteil der Fall (Abb. 5b), ohne daß sich jedoch karzinomspezifische Unterschiede erkennen ließen.

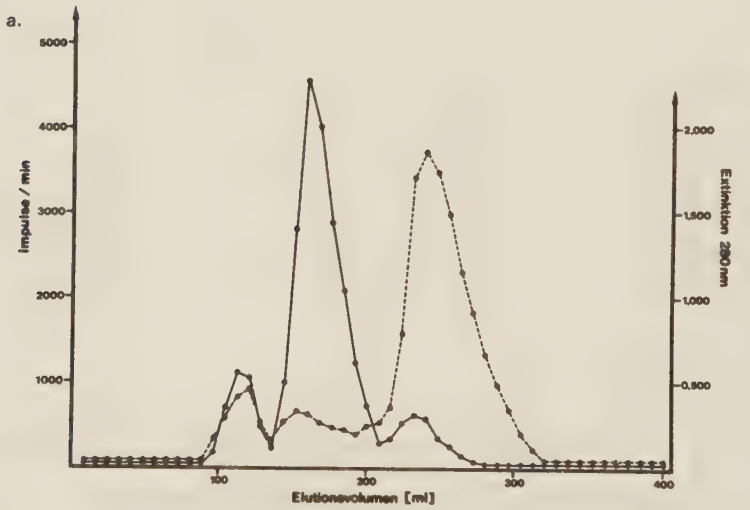


Abb. 5
Elutionsprofil der vorgereinigten Asziteslipid-Proteinfraktion auf Biogel A-5m
a. bei gastrointestinalen Karzinomen
●——● ^{3}H-Cholesterin-Impulse pro Minute
o---o Extinktion bei 280 nm

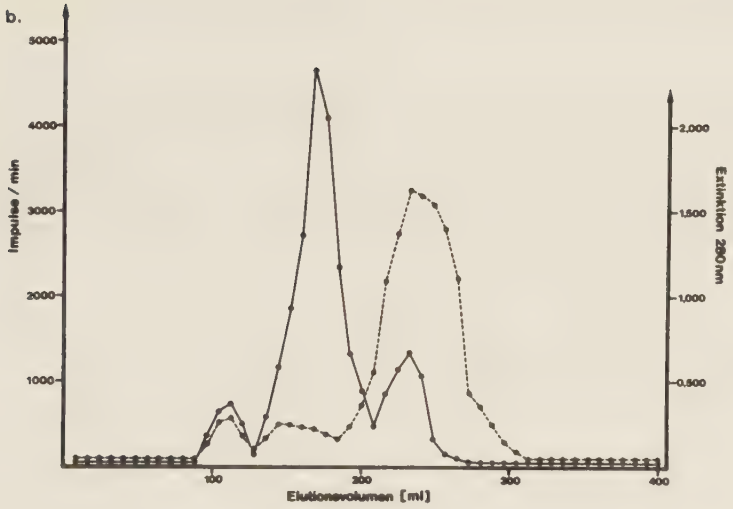


Abb. 5
Elutionsprofil der vorgereinigten Aszites-lipid-Proteinfraktion auf Biogel A-5m
b. bei gynäkologischen Karzinomen
●——● ^{3}H-Cholesterin-Impulse pro Minute
o---o Extinktion bei 280 nm

Da der erste Peak im Ausschlußvolumen der Säule erschien, mußte das Molekulargewicht des an dieser Stelle eluierenden Asziteslipoproteins ALP größer als 5 x 10^{6} D sein.

3.3.1.2. Prozentuale Lipidverteilung auf die säulenchromatographisch gewonnenen Lipoproteinfraktionen

Die prozentuale Lipidverteilung auf die einzelnen Lipoproteinfraktionen wurde für die drei untersuchten Kollektive berechnet. In der Regel fand sich der größte Anteil der Lipide in der LDL-Fraktion. Die ALP-Fraktion enthielt zwischen 1,4 und 38,5 % der Einzelkomponenten.

Weitere nach Karzinomtypen aufgeschlüsselte Daten enthält Tabelle 8.

Tabelle 8: Prozentuale Lipidverteilung auf die einzelnen Lipoproteinfraktionen

	ALP-Fraktion		LDL-Fraktion		HDL-Fraktion	
	Spannweite B (%)	Median $\tilde{x}$ (%)	Spannweite B (%)	Median $\tilde{x}$ (%)	Spannweite B (%)	Median $\tilde{x}$ (%)
Gastrointestionale Karzinome						
Cholesterin	2,3 - 27,1	11,1	40,5 - 79,9	63,0	15,0 - 39,2	21,5
Triglyzeride	1,7 - 30,4	19,7	34,1 - 83,9	54,3	17,4 - 41,9	29,6
Phospholipide	1,8 - 27,4	13,8	37,6 - 76,7	52,6	15,9 - 48,8	33,2
Ovarialkarzinome						
Cholesterin	1,4 - 24,9	11,0	55,7 - 81,3	64,5	12,4 - 43,9	20,5
Triglyzeride	3,4 - 38,5	24,9	32,4 - 79,2	46,3	17,4 - 43,5	25,1
Phospholipide	1,5 - 28,7	9,4	34,4 - 79,7	47,6	14,3 - 45,9	36,3
Mammakarzinome						
Cholesterin	3,4 - 30,9	12,1	32,1 - 77,0	54,1	11,2 - 45,9	23,7
Triglyzeride	5,7 - 36,1	24,4	33,1 - 61,2	44,0	19,7 - 42,0	33,1
Phospholipide	2,4 - 18,6	8,9	29,2 - 78,4	49,9	13,0 - 41,3	30,4

3.3.1.3. Wiederfindungsrate für Lipide

Die Recovery für Lipide im Aszites nach Gelchromatographie und Ultrafiltration betrug für alle drei Komponenten ca. 50%, ungeachtet welcher Primärtumor zugrunde lag. Die genauen Werte sind Tabelle 9 zu entnehmen.

Tabelle 9: Recovery (%) für Lipide im Aszites nach Gelchromatographie und Ultrafiltration bei allen Proben

	Spannweite B (%)	Median $\tilde{x}$ (%)
Triglyzeride	47,1 - 85,3	53,1
Cholesterin	44,3 - 88,1	49,1
Phospholipide	38,6 - 82,5	48,8

3.3.2. Ouchterlony-Immundiffusion

Zur weiteren Charakterisierung der durch Gelfiltration erhaltenen Fraktionen wurde die doppelte radiale Immundiffusion nach Ouchterlony eingesetzt.
Mit Antiseren gegen Human-alpha- und -beta-Lipoprotein konnte der zweite im LDL-Bereich eluierende Peak als LDL, der dritte als HDL identifiziert werden. Oberschneidungen traten nur in geringem Umfang auf.
Zu Kontrollzwecken getesteter Nativaszites zeigte mehrere durch spezielle Lipoproteinfärbemethoden gut sichtbare Präzipitationslinien mit Anti-Humanserum (Abb. 6).

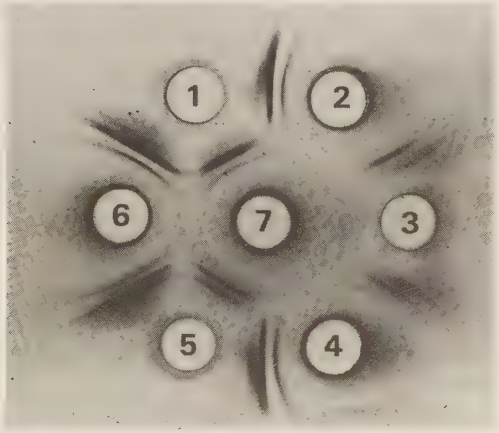


Abb. 6
Immundiffusion von Nativaszites gegen Antihumanserum
1,3,5 : Antihumanserum
2,4,6,7: Nativaszites

Nur im Fall des Patienten mit chylösem Aszites reagierte auch der erste Peak mit Anti-alpha- und Anti-beta-Lipoprotein (Abb. 7). Doch war bei Beteiligung des lymphdrainierenden Systems das Auftreten von VLDL im Aszites nicht verwunderlich.
In allen anderen Fällen reagierte das im Ausschlußvolumen erscheinende Asziteslipoprotein ALP weder

Abb. 7
Immundiffusion der aus chylösem Aszites gewonnenen makromolekularen Lipoproteinfraktion gegen Anti-alpha- und Anti-beta-Lipoprotein
1,2: Anti-beta-Lipoprotein
4,5: Anti-alpha-Lipoprotein
7 : makromolekulare Lipoproteinfraktion aus chylösem Aszites
3,6: frei

mit Anti-alpha- noch mit Anti-beta-Lipoprotein. Da auch Reaktionsansätze nach vorheriger Konzentration des isolierten Asziteslipoproteins erfolglos blieben, schien eine immunologische Identität des ersten Peaks mit VLDL eher unwahrscheinlich.

Mit Anti-Humanalbumin hingegen zeigte sich eine Reaktion, die durch Ultrazentrifugation bei 50000 Upm (s. 3.3.3.) abgeschwächt, aber nicht völlig unterbunden werden konnte (Abb. 8).

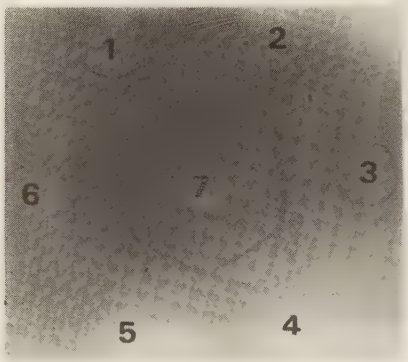


Abb. 8
Immundiffusion des makromolekularen Asziteslipoproteins nach Ultrazentrifugation gegen Antialbumin
1-6: Antialbumin
7 : ALP

Von Frau U. Behrens, New York zur Verfügung gestellte Antikörper gegen membranständige Antigene von Leberzellen (Liver-Specific Lipoprotein LSP) zeigten eine deutliche Präzipitationslinie mit dem makromolekularen Asziteslipoprotein ALP, die wegen schlechter Anfärbbarkeit im Dunkelfeld betrachtet wurde (Abb. 9). Damit sind immunologisch gleiche Antigen-Determinanten von ALP und LSP zumindest sehr wahrscheinlich.

Abb. 9
Immundiffusion des makromolekularen Asziteslipoproteins gegen Anti-LSP-Serum
2,4,6: : ALP
1,3,5,7: Anti-LSP

Schwache Kreuzreaktion des LSP-Antiserums mit Anti-Humanserum wurden beobachtet, wohingegen der LSP-Antikörper mit Nüchternblut der entsprechenden Karzinompatienten keine Reaktion ergab.

Diese Resultate trafen für alle drei Patientenkollektive in gleicher Weise zu.

3.3.3. Gradientenultrazentrifugation

Zur Abtrennung von Verunreinigungen und zur Bestimmung der Dichte des Aszites-lipoproteins ALP wurde eine isopyknische Gradientenultrazentrifugation bei 50000 Upm durchgeführt. Bei Verwendung einer Caesiumchloridlösung der Dichte 1,15 g/ml baut sich der in Abb. 10 dargestellte exponentielle Gradient von 1,030 g/ml bis 1,300 g/ml auf.

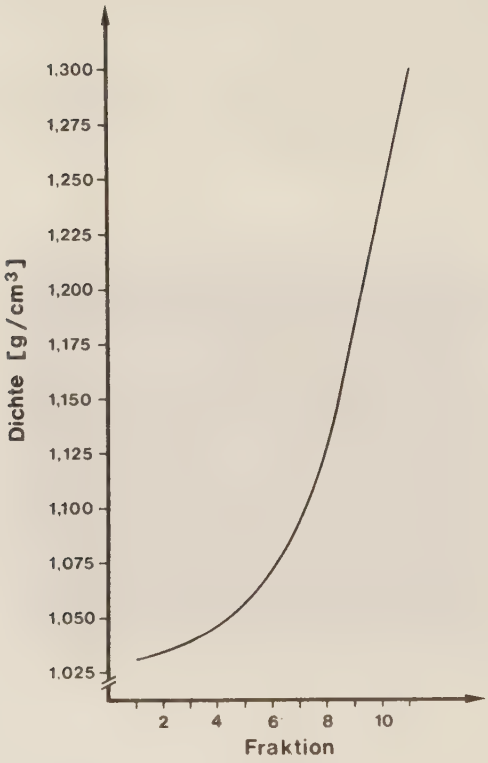


Abb. 10

Exponentieller Caesiumchloridgradient nach 72-stündiger Ultrazentrifugation bei 50000 Upm

In den durch Abpipettieren gewonnenen Fraktionen 8 und 9 zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Extinktion bei 280 nm und der von ^{3}H-Cholesterin ausgesendeten Impulse pro Minute. Somit liegt das Aszitespoprotein ALP in einem Dichtebereich von 1,128 bis 1,181 g/ml und unterscheidet sich trotz seines Molekulargewichts von mehr als 5 Mill. D deutlich von VLDL und LDL (Abb. 11).
Der geringgradige Anstieg von Extinktion und Impulsen im Dichtebereich um 1,048 g/ml beschreibt minimale Verunreinigungen mit LDL, was mittels Ouchterlony-Immundiffusion nachgewiesen werden konnte.

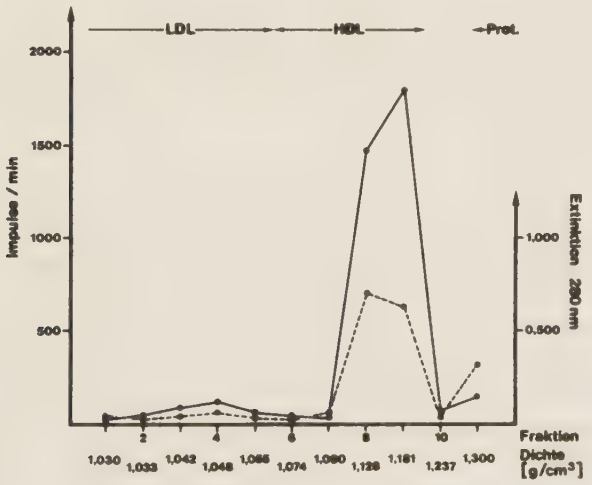


Abb. 11
Ultrazentrifugielle Bestimmung der Dichte des Aszitespoproteins und Abtrennung von Verunreinigungen
●——● ^{3}H-Cholesterin-Impulse pro Minute
o---o Extinktion bei 280 nm

Der Anstieg der Extinktion in Fraktion 11 ist durch abgetrennte Proteine, vor allem alpha$_2$-Makroglobulin und Albumin bedingt. Die radioaktiven Impulse beruhen wahrscheinlich auf einer Verschleppung beim Abpipettieren.

Die Aszitesproben aller drei Patientengruppen lagen im gleichen, relativ engen Dichteintervall. Dies spricht für eine ziemlich einheitliche Dichte der makromolekularen Aszitesliposproteine.

3.3.4. Protein- und Lipidkomposition des makromolekularen Aszitesliposproteins ALP

Nach ultrazentrifugieller Abtrennung von Verunreinigungen schien die Aufklärung der Protein- und Lipidkomposition des Aszitesliposproteins ALP sinnvoll.
Innerhalb der drei untersuchten Patientengruppen wurden große Ähnlichkeiten, aber auch geringgradige Unterschiede entdeckt: Mit ca. 65% stellt der Proteinanteil die Hauptkomponente dar, gefolgt von den Triglyzeriden mit ca. 20%. Gesamtcholesterin und Gesamtphospholipide nahmen abwechselnd den dritten bzw. vierten Rang ein. Weitere Einzelheiten sind Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Prozentuale Protein- und Lipidzusammensetzung des Aszites-lipoproteins ALP

	Spannweite B (%)	Median $\tilde{x}$ (%)
Gastrointestinale Karzinome		
Protein	60,9 - 68,4	65,1
Cholesterin	4,2 - 13,1	7,2
Triglyzeride	11,3 - 21,5	17,7
Phospholipide	8,6 - 15,3	10,0
Ovarialkarzinome		
Protein	59,3 - 68,2	64,6
Cholesterin	1,8 - 9,4	3,4
Triglyzeride	16,4 - 23,1	21,9
Phospholipide	7,9 - 14,8	10,1
Mammakarzinome		
Protein	62,8 - 70,0	67,3
Cholesterin	5,3 - 14,5	11,8
Triglyzeride	12,8 - 20,9	17,6
Phospholipide	2,9 - 11,4	3,3

Der Phospholipidanteil wurde mittels quantitativer Dünnschichtchromatographie weiter aufgeschlüsselt. Nach Anfärbung mit Molybdatophosphorsäure konnte mit Referenzsubstanzen verglichen werden (Abb. 12).

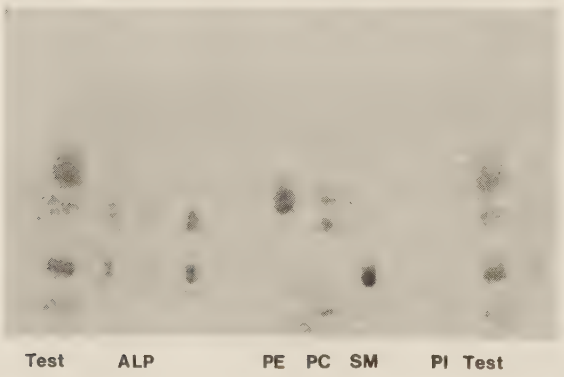


Abb. 12
Dünnschichtchromatographische Auftrennung des Phospholipidanteils nach Anfärbung mit Molybdatophosphorsäure
Test (v.u.n.o.): Phosphatidylinositol, Sphingomyelin, Phosphatidylcholin, Cardiolipin
ALP: Aszites-Lipoprotein
PE : Phosphatidyläthanolamin
PC : (Lyso-)Phosphatidylcholin
SM : Sphingomyelin
PI : Phosphatidylinositol

Tabelle 11 gibt die mittlere prozentuale Zusammensetzung des Phospholipidanteils aus Cardiolipin (CL), Phosphatidyläthanolamin (PE), (Lyso-)Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylinositol (PI) und Sphingomyelin (SM) wieder. Vor allem im Phosphatidyläthanolamin- und Phosphatidylcholingehalt waren in den drei untersuchten Patientenkollektiven teilweise nicht unerhebliche Abweichungen vorhanden. Phosphatidylserin wurde nicht gefunden.

Tabelle 11: Mittlere prozentuale Zusammensetzung des Phospholipidanteils des makromolekularen Aszites-lipoproteins ALP.

	Gastrointestinale Karzinome (%)	Ovarialkarzinome (%)	Mammakarzinome (%)
CL	4,3	0,2	2,4
PE	30,1	13,8	17,8
PC	11,2	31,2	34,3
PI	22,4	17,3	11,9
SM	26,6	33,1	30,9

3.3.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur weiteren Charakterisierung des Proteinanteils des Asziteslipoproteins ALP wurde eine SDS-Disk-PAGE durchgeführt.
Markerproteine bekannter Größe wurden als Referenzsubstanzen gewählt. Der dekadische Logarithmus ihrer Molekulargewichte, aufgetragen gegen die relative Beweglichkeit, lieferte die in Abb. 13 dargestellte Eichkurve.

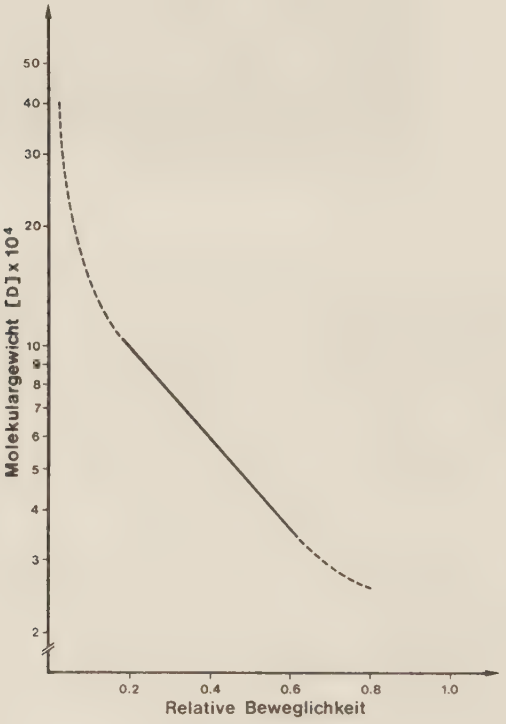


Abb. 13
Eichkurve für die elektrophoretische Molekulargewichtsbestimmung der Asziteslipoproteinuntereinheiten

3.3.5.1. Patienten mit Adenokarzinomen des Gastrointestinaltrakts

Die Elektrophorese in Abb. 14a zeigt eine dreifache Verdünnungsreihe des aus dem Aszites von Patienten mit Adenokarzinomen des Gastrointestinaltrakts isolierten makromolekularen Lipoproteins neben Referenzproteinen. Die densitometrische Auswertung und das ermittelte Molekulargewicht der Untereinheiten flankieren die Gele. Insgesamt erschienen 11 Banden nach Färbung mit Serva Blau R.

Die Apoproteine des Blutes A, B und C konnten nicht sicher gefunden werden. Wenn überhaupt, dürften sie nur in Spuren vorhanden sein. Apoprotein A liefe im Bereich zwischen Bande 5 und 6, Apoprotein B müßte an der Auftragstelle liegenbleiben und Apoprotein C wäre hinter Bande 11 zu erwarten. Bande 5 zeigte die gleiche Mobilität wie Albumin. Das Vorkommen dieses Serumproteins war auch schon durch die Immundiffusion belegt worden.
Die Höhe der Densitogrammausschläge gibt halbquantitativ Auskunft über die Konzentration der Untereinheiten. Das Molekulargewicht der 9 Hauptbanden 3 - 11 liegt zwischen 29000 und 80000 D.

Die Einzelwerte sind Abb. 14a zu entnehmen.

a.

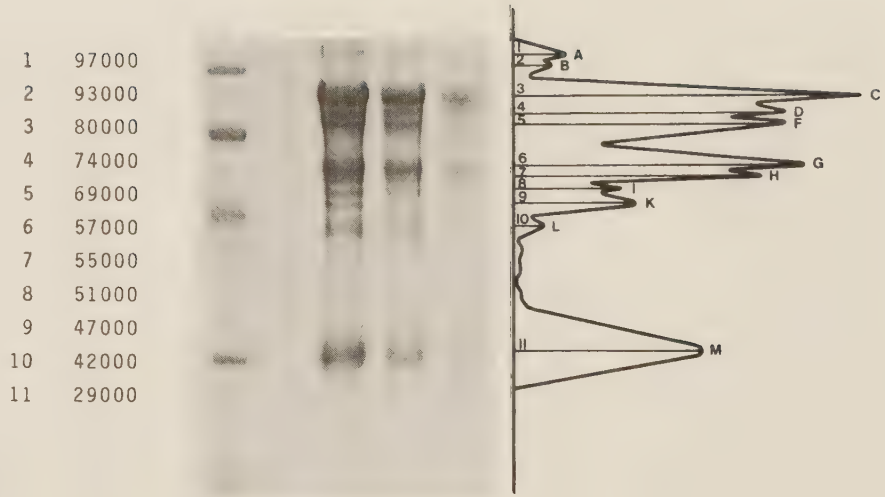


Abb. 14
SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese des makromolekularen Aszitesiipoproteins in 3 verschiedenen Probenkonzentrationen und densitometrische Auswertung mit Molekulargewicht der Untereinheiten
a. Adenokarzinome des Gastrointestinaltrakts

3.3.5.2. Patientinnen mit gynäkologischen Karzinomen

Abbildung 14b stellt drei Elektrophoresen derselben Probe vor Ultrazentrifugation einer dreifachen Verdünnungsreihe des gleichen Aszitеslipoproteins nach ultrazentrifugieller Reinigung gegenüber. In der Mitte wurden Markerproteine aufgetragen. Vor allem zwischen den Banden 8 und 10 ließen sich kontaminierende Polypeptide entfernen, sodaß das eigentliche Apoproteinmuster des Aszitеslipoproteins zum Vorschein kam.

Zwischen den beiden Patientenkollektiven mit Ovarial- bzw. Mammakarzinomen konnten keinerlei Unterschiede festgestellt werden.
Die 10 Untereinheiten lagen im Molekulargewichtsbereich von 27000 bis 98000 D. Albumin (Bande 6) war auch im gynäkologischen Patientengut vertreten, allerdings in etwas geringerer Konzentration. Anhalt für das Auftreten von Apoproteinen aus Plasma gab es wiederum nicht.

In Abbildung 14a und b mit gleichen großen lateinischen Buchstaben gekennzeichnete Banden besitzen gleiches ($\pm$ 10%) Molekulargewicht. Untereinheit E (MG 72000 D) war im gastroenterologischen Patientengut nicht zu finden. Dafür fehlte Bande H (MG 55000 D) in Abb. 14b. Bande K (MG 47000 D) ist im Densitogramm angedeutet.
Der wesentliche Unterschied ist also nicht in karzinomspezifischen Untereinheiten, sondern vielmehr in deren unterschiedlicher Konzentration zu suchen.

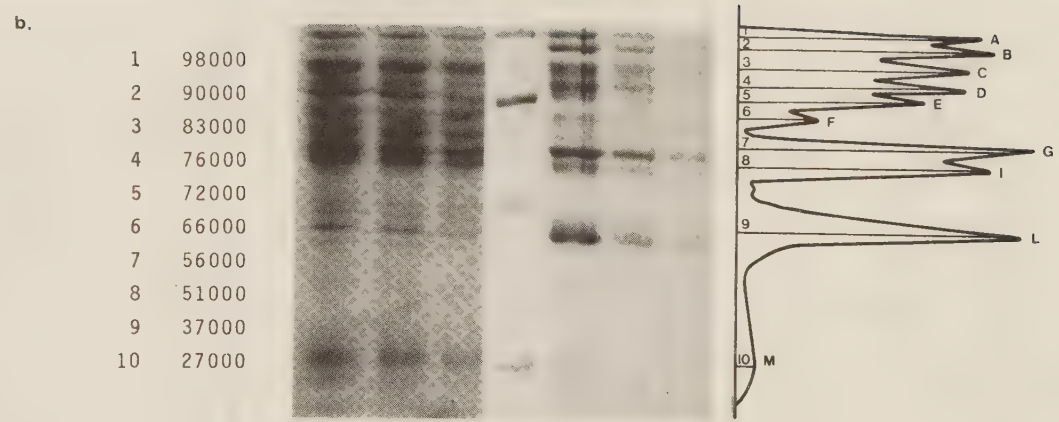


Abb. 14
SDS-PAGE des makromolekularen ALP vor Ultrazentrifugation (3 x dieselbe Probe) und danach (3fache Verdünnungsreihe) neben Densitogramm und Molekulargewicht der Untereinheiten
b. Gynäkologische Karzinome

Zum Ausschluß abnormer Beweglichkeiten wie sie für einzelne Lipoproteine beschrieben sind (Swaney, J.B. et al., 1974) wurden SDS-Elektrophoresen in Gelen verschiedener Porengröße (T = 7%, T = 10%, T = 12,5%) durchgeführt, die mit obigen Resultaten gute Übereinstimmung zeigten. Der Logarithmus der relativen Beweglichkeit R_f aufgetragen gegen die Acrylamidkonzentration im Gel T ergab wieder eine Gerade.

Im zweiten bzw. dritten säulenchromatographisch fraktionierten Peak konnten neben anderen Serumproteinen Apoprotein B bzw. Apoprotein A und in geringen Mengen auch Apoprotein C entsprechend LDL bzw. HDL nachgewiesen werden.

3.3.6. Elektronenmikroskopie

Weiteren Anhalt für den Lipoproteincharakter der im Aszites von Karzinompatienten gefundenen Makromoleküle lieferte die Elektronenmikroskopie.
Nach Anwendung des besonders zur Darstellung von Lipoproteinen geeigneten Negative Staining zeigte die elektronenmikroskopische Aufnahme kreisrunde Gebilde mit schwarzem Rand, die den heutigen Vorstellungen von Lipoproteinen entsprachen (Abb. 15).

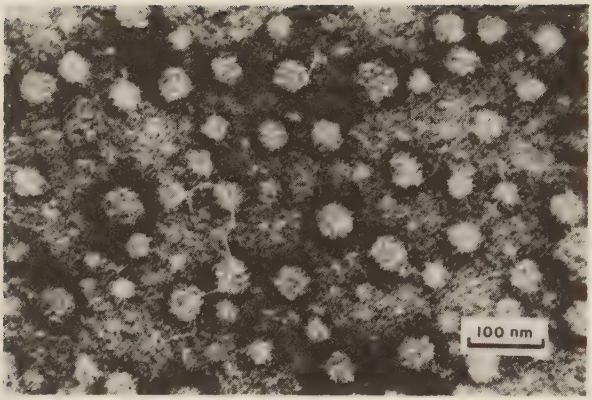


Abb. 15
Elektronenmikroskopische Abbildung (Vergr. 1:100000) des makromolekularen Aszites-lipoproteins

Die Größe der Makromoleküle war relativ einheitlich. Ihr Durchmesser schwankte zwischen 36 und 64 nm, woraus sich näherungsweise ein mittleres Molekulargewicht errechnen ließ:
In der Annahme, es handle sich um globuläre Moleküle, wurde das Molekülvolumen nach der Formel $V = \frac{4}{3}\pi \times r^3 = 6{,}54 \times 10^{-17}$ cm^3 ermittelt. Durch Multiplikation mit der ultrazentrifugiell bestimmten mittleren Dichte von 1,15 g/cm^3 ergab sich eine absolute Molekülmasse von $7{,}53 \times 10^{-17}$ g. Bezogen auf 1/12 der absoluten Atommasse von Kohlenstoff entsprach dies einem Molekulargewicht von ca. 45 Mill. D.

4. DISKUSSION

4.1. PATIENTENGUT

Grundlage vorliegender Untersuchung bildete ein selektioniertes Patientengut. Es handelte sich um erwachsene Karzinomträger, die infolge ihres fortgeschrittenen Karzinomleidens Peritonealergüsse entwickelt hatten und sich deswegen in stationärer Behandlung eines Krankenhauses höchster Versorgungsstufe befanden. Aus organisatorischen Gründen konnten keineswegs alle die Einschlußkriterien erfüllenden Patienten im Sammlungszeitraum vollständig erfaßt werden.

Die Aszitespunktion wurde vor Einsatz zytostatischer Medikamente vorgenommen, um die Lipoproteine in unveränderter Form untersuchen zu können.

Das gastroenterologische Patientenkollektiv erscheint nur bei oberflächlicher Betrachtung heterogen. Allen Erkrankten war ein in Leber und/oder Peritoneum metastasierendes Adenokarzinom des Gastrointestinaltrakts gemeinsam. Unterschiede bestanden nur hinsichtlich der Lokalisation des Primärtumors.
Die Aszitesflüssigkeit eines Magenkarzinompatienten (Tab. 1, Nr. 1) war bereits für das bloße Auge erkennbar milchig-trüb gefärbt und nahm bezüglich der Lipidkonzentration eine Ausnahmestellung ein. Der

Autopsiebefund belegte die Abflußbehinderung durch in den Ductus thoracicus eingebrochene Tumormetastasen, die zum Obertritt von Lymphflüssigkeit in den Aszites geführt hatte.

4.2. METHODIK

4.2.1. Aufbewahrung der Proben

Die Bearbeitung der Aszitesproben im Kühlraum schloß sich unmittelbar an die Punktion an. Durch Zusatz einer Konservierungslösung aus 0,2 g/l Natriumazid und 0,5 mmol/l Phenylmethansulfonylfluorid wurde der bakterielle Abbau der Lipoproteine deutlich hinausgezögert. In NaCl-EDTA-Puffer konnten die Aszitespoproteine portioniert bis zu 6 Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden, ohne daß eine Änderung des Protein- und Lipidgehalts oder der immunologischen Eigenschaften feststellbar war. Lagerung bei -5 °C oder wiederholtes Auftauen und Wiedereinfrieren führte dagegen zu irreversibler Ausfällung von LSP, das in Abwesenheit von EDTA sogar nur 2 bis 4 Tage stabil war (McFarlane, I.G. et al., 1977).

4.2.2. Quantitative Messung von Protein und Lipidkomponenten

Hämorrhagische Proben wurden von der Verarbeitung ausgeschlossen, da Serumlipoprotein- und Membrankomponenten zerstörter Erythrozyten vor allem die Lipidkonzentrationen beeinflußten. Indessen verfälschte die Zugabe von Konservierungslösung die Ergebnisse nicht.

Die Proteinmessung wurde nach Lowry durchgeführt, da diese Methode 100-fach sensitiver und viel weniger störempfindlich gegenüber Trübungen ist als die Biuret-Reaktion. Dies ist gerade bei Bestimmungen in Nativaszites von Wichtigkeit.
Die Phospholipidquantifizierung erfolgte nach Extraktion durch photometrischen Nachweis von Phosphor, dessen Menge zur Phospholipidkonzentration in der Probe direkt proportional ist.
Neutralfette und Gesamtcholesterin wurden mit enzymatischen Test-Kits bestimmt. Fehlerquelle bei der Triglyzeridbestimmung kann eine geringgradige Glyzerinfreisetzung aus Phospholipiden sein, welche durch die Glyzerokinase miterfaßt wird.
Bei der Cholesterinbestimmung wurde die Esterspaltung enzymatisch durchgeführt.
Lipidkontrollseren dienten der Richtigkeitsbestimmung.

4.2.3. Gelfiltrationschromatographie

Die Gelfiltrationschromatographie hat in den letzten Jahren bei der Isolierung von Lipoproteinen immer häufiger Anwendung gefunden (Meyer zum Büschenfelde, K.H. et al., 1972; Mathur, S.N., Spector, A.A., 1975; Malmendier, C.L., Amerijckx, J.P., 1975; McFarlane, I.G. et al., 1976; Behrens, U.J., Paronetto, F., 1979; Suzuki, N. et al., 1980).
Nach Abfiltrieren von porenverstopfendem Material zeichnet sie sich durch hohe Trennschärfe und gute Reproduzierbarkeit aus.

Die photometrische Proteinmessung, die auf der UV-Lichtabsorption von aromatischen Aminosäuren beruht, ist nicht spezifisch und nur ungenau, da die Menge der in verschiedenen Proteinen auftretenden absorbierenden Aminosäuren variiert. Sie ist aber zur schnellen Orientierung gerechtfertigt und erspart aufwendige Reihenbestimmungen.

^{3}H-Cholesterin bewirkt eine rasche Markierung der cholesterinenthaltenden Fraktionen, die aber keine quantitativen Rückschlüsse zuläßt.

4.2.4. Ouchterlony-Immundiffusion

Die Immundiffusion nach Ouchterlony wurde in 1%igem Agarose-Agar und in 2%igem Bacto-Agar durchgeführt.

Ließ man das Antigen 8 Stunden vordiffundieren, erhielt man bessere Resultate, da größere Mengen des makromolekularen Antigens die Antikörperfront erreicht hatten. Nach Zusatz von 1% SDS, welches die Diffusionsgeschwindigkeit großer Moleküle durch Zerlegung in ihre Untereinheiten steigert, fand die Reaktion beschleunigt statt.
Die zum Nachweis einer sichtbaren Präzipitationslinie erforderliche Proteinkonzentration betrug mindestens 0,1 mg/ml. Diese wurde, wenn nötig, durch Einengen in Kollodiumhülsen (Ausschlußgrenze 12500 D) hergestellt.

Die Ouchterlony-Immundiffusion erlaubt die Aufdekkung gleicher antigener Determinanten und damit den Nachweis immunologischer Identität.

4.2.5. Gradientenultrazentrifugation

Die Gradientenultrazentrifugation wurde in optisch reiner CsCl-Lösung durchgeführt, um anschließende photometrische Bestimmungen nicht durch Verunreinigungen zu verfälschen.
Zur Fraktionierung des Röhrcheninhalts erwies sich Abpipettieren als die praktikabelste Methode.
Die Dichte der Fraktionen wurde durch Wiegen auf einer Präzisionswaage bestimmt, da ein vorzuziehendes Refraktometer nicht zur Verfügung stand.

4.2.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Erhebliche methodische Schwierigkeiten traten bei der Durchführung der SDS-PAGE auf.
Die Proteinkonzentration des hochgereinigten Aszi-teslipoproteins war häufig für eine Anfärbung mit Serva Blau R zu gering. Außerdem sorgte der durch SDS nicht immer vollständig abgetrennte Lipidanteil für ständiges Hintergrundschmieren.
Eine exakte Molekulargewichtsbestimmung war nur im Bereich zwischen 30000 und 105000 D möglich, da die Eichkurve außerhalb dieser Grenzen nicht mehr linear war (Abb. 13).

Abnorme Beweglichkeiten des Asziteslipoproteins wie sie für Proteine, die unverhältnismäßig hohe Mengen von SDS binden, beschrieben sind (Swaney, J.B. et al., 1973), wurden durch Probeläufe in Gelen verschiedener Acrylamidkonzentrationen T ausgeschlossen (Ferguson, K.A., 1964).

4.2.7. Elektronenmikroskopie

Die Methode des Negative Staining gestattet in hervorragender Weise die elektronenmikroskopische Darstellung von Lipoproteinen. Sie darf jedoch keinesfalls als lipoproteinspezifisch betrachtet werden.

4.3. ERGEBNISSE

4.3.1. Erscheinungsform der Aszites lipide

Aszites lipide scheinen vorwiegend in an Proteine gebundener Form vorzuliegen. Bereits 1978 wurde auf die gute positive Korrelation zwischen Protein und Cholesterin in Peritonealergüssen unterschiedlichster Genese hingewiesen (Polak, M., 1978). Diese in vorliegender Arbeit bestätigten Befunde könnten auf ein relativ fixes Verhältnis zwischen Eiweiß und Cholesterin hindeuten, wie dies in Lipoproteinen der Fall ist. Die Phospholipide erwiesen sich als variabelste Komponente, sodaß hohe Cholesterin- oder Triglyzeridtiter keineswegs immer mit hohen Phospholipidspiegeln einhergingen.

Unterstützt wurden diese Vermutungen durch den immunologischen Nachweis von LDL und HDL sowie durch die Gelfiltrationschromatographie: Protein- und Lipidanteil des Aszites-Makromoleküls eluierten an gleicher Stelle (Abb. 5), obwohl aufgrund der unterschiedlichen Molekulargewichte getrenntes Erscheinen in niedrigeren Bereichen zu erwarten gewesen wäre. Selbst nach Zusatz des stark delipidisierend wirkenden Natriumdodezylsulfat gelang es nur in übermäßig hohen Konzentrationen von mehr als 57,5 mg SDS/mg Lipoprotein eine Trennung zu bewirken (Suzuki, N. et al., 1980). Dies spricht für die Festigkeit der Bindung, die bei einem zufällig gebildeten Komplex unwahrscheinlich wäre.

Weiteren Hinweis für den Lipoproteincharakter der Aggregate lieferten die elektronenmikroskopischen Bilder. Nach Anwendung des Negative Staining zeigten sich von einem schwarzen Rand umgebene kreisförmige Gebilde von ziemlich einheitlicher Größe und Struktur, deren Aussehen sich mit dem bekannter Lipoproteine deckte (Abb. 15).

4.3.2. Charakterisierung der Aszites-lipoproteine und ihre Karzinomspezifität

Alle bekannten Blutlipoproteine können auch im Aszites auftreten (Malmendier, C.L., Amerijckx, J.P., 1977).
Es gelang uns, Low Density Lipoproteine (LDL) und High Density Lipoproteine (HDL) immunologisch bzw. ihre Apoproteine A, B und C elektrophoretisch in den untersuchten Punktaten nachzuweisen, wobei LDL den Hauptanteil der Aszites-lipoproteine ausmachen dürfte. In einem Fall von chylösem Aszites ergab sich auch Anhalt für das Vorkommen von Very Low Density Lipoproteinen (VLDL). Außerdem wurde ein makromolekulares Aszites-lipoprotein ALP gefunden, das sich in keine Gruppe der bisher bekannten Serumlipoproteine einordnen ließ:
Seine anteilsmäßig größte Komponente ist das Protein, dessen Median innerhalb der drei verschiedenen Patientengruppen von 64,6 bis 67,3 % schwankte. Das Oberwiegen des Proteins läßt sich gut mit der hohen ultrazentrifugiell ermittelten Dichte von 1,128 bis

1,181 g/ml vereinbaren. Doch dürfte der Proteinanteil unter Nativbedingungen eher geringer sein, da als Folge partieller Delipidisierung bei der Ultrafiltration Lipide verloren gehen.
Zweitstärkste Fraktion in allen Kollektiven waren die Triglyzeride mit einem auf Medianbasis errechneten prozentualen Anteil von 17,6 bis 21,9 %. Auf den Triglyzeridreichtum von Aszitesliproteinen wurde bereits von anderer Seite hingewiesen (Brenneman, D.E. et al., 1975; Malmendier, C.L., Amerijckx, J.P., 1976; Suzuki, N. et al., 1980).
Das Gesamtcholesterin und die Gesamtphospholipide nahmen mit 3,4 bis 11,8 % bzw. 3,3 bis 10,1 % abwechselnd Rang 3 und 4 ein. Dies entspricht früheren Resultaten anderer Autoren (Meyer zum Büschenfelde, K.H., Miescher, P.A., 1972; Martin, R., 1983), die in Aszitesliproteinen einen höheren Phospholipidgehalt als in Plasmalipoproteinen feststellten.
Da bei Affinitätschromatographiestudien auf einer Con A-Sepharose-Säule keine oder eine nur äußerst geringfügige Retention von ALP festzustellen war, konnten weitere quantitative Mono- und Polysaccharidbestimmungen unterlassen werden. Andere Untersucher fanden im Mikrogrammbereich liegende, im Vergleich zu den anderen Komponenten 100-fach geringere Zucker-Konzentrationen (Nath, K., 1968).

Da ALP im Ausschlußvolumen der Biogel A-5m-Säule läuft, ist ein Molekulargewicht von mehr als 5 Mill. D anzunehmen. Dies läßt sich gut mit dem elektronenmikroskopischen Bild vereinbaren, aus dem sich überschlagsmäßig ein mittleres Molekulargewicht von ca. 45 Mill. D errechnen läßt.

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese enthüllte in der Gruppe gastrointestinaler Karzinome 11 Untereinheiten. Die 9 Hauptbanden lagen zwischen 29000 und 80000 D (Abb. 14a). Das makromolekulare Aszites-lipoprotein der gynäkologischen Tumoren bestand aus 10 Untereinheiten, deren Molekulargewicht zwischen 27000 und 98000 D schwankte (Abb. 14b). Bande E konnte bei den Malignomen des Magen-Darm-Trakts nicht nachgewiesen werden. Dies könnte jedoch auch auf der mangelnden Trennschärfe des Densitometers beruhen. Hingegen fehlte Bande H in Abb. 14b völlig, Bande K war nur angedeutet. Wie auch durch die Immundiffusion belegt, war Albumin (Bande F) das einzige in nennenswerter Konzentration vorkommende Serumprotein. Apoprotein A, B oder C konnten nicht nachgewiesen werden. Sofern Apoproteine des Plasmas überhaupt vorhanden sind, dürften sie nur eine untergeordnete Rolle spielen.

In Anbetracht der allen Patienten gemeinsamen Peritonealkarzinose scheint es nicht verwunderlich, daß keine karzinomspezifischen Untereinheiten gefunden werden konnten. Der Hauptunterschied zwischen den einzelnen Karzinomtypen lag vielmehr in Konzentrationsdifferenzen, ohne daß jedoch aus der Farbintensität der Einzelbanden auf die Grunderkrankung geschlossen werden konnte. Einzelne nicht bei allen Patienten auftretende Untereinheiten könnten in Konzentrationen unter der Nachweisgrenze vorliegen.

Aufgrund sehr ähnlicher bio- und physikochemischer Eigenschaften darf gefolgert werden, daß es sich bei den aus Peritonealergüssen verschiedener Genese isolierten makromolekularen Lipoproteinen um dieselbe

Substanz handelt. Diese zeigte eine deutliche Präzipitationslinie mit gegen membranständige Leberzelloberflächenantigene gerichtetem LSP-Antiserum, was für gleiche antikörperspezifische Determinanten spricht (Abb. 9).
Das Liver Specific Lipoprotein besitzt ein säulenchromatographisch ermitteltes Molekulargewicht von mehr als 20 Mill. D, Apo-LSP liegt zwischen 4 und 20 Mill. D (McFarlane, I.G. et al., 1977). Auch die früher ermittelte Dichte von 1,147 g/ml (Behrens, U., Paronetto, F., 1979) zeigt gute Kongruenz mit unseren Ergebnissen. Elektrophoretisch wurden 8 - 13 Banden im Bereich von 40000 bis 95000 D nachgewiesen. Ein 2%iger Albuminanteil, der durch Rechromatographie deutlich vermindert werden konnte, war immer vorhanden. Vermutlich handelt es sich hierbei nicht um ein Apoprotein.

Verschiedene Beschreibungen des LSP in der Literatur zeigen teilweise erhebliche Abweichungen. In Anbetracht methodenimmanenter Ungenauigkeiten muß eine enge Verwandtschaft, wenn nicht sogar Identität zwischen LSP und ALP angenommen werden.

4.3.3. Mögliche Herkunft der Aszitеslipoproteine

Verschiedentlich wurde Aszites als durch Filtrationsprozesse entstandenes Transsudat des Blutes aufgefaßt (Spector, A.A., 1975). Viele Entsprechungen zwischen Ergußflüssigkeit und Plasma, wie z. B.

die gleiche Größenordnung der Protein-, Cholesterin- und Triglyzeridkonzentration sowie das Vorkommen von Albumin und Serumlipoproteinen sprechen dafür. Doch lassen sich damit die teils beträchtlichen Unterschiede der Phospholipidkonzentrationen in Plasma und Aszites nicht erklären. Dazu müßte entweder eine gesteigerte Neusynthese von Phospholipiden stattfinden, wie sie für einige Gehirntumoren beschrieben wurde (Weiss, J.F., 1975) oder zumindest eine verstärkte Sekretion von Lipiden in den Aszites erfolgen. Für Cholesterin konnte eine Freisetzung aus Ehrlich-Aszites-Tumorzellen in das den Tumor umgebende Medium in vitro bereits nachgewiesen werden (Jackson, R.L., Gotto, F.M., 1975).

Ein weiterer möglicher Herkunftsort für Asziteslipoproteine sind Oberflächenmembranen oder das Zellinnere von Organen, die durch den Tumor lokal infiltriert und von Aszites umspült werden. Das invasive Wachstum könnte zur Loslösung von Membranlipoproteinen führen, welche schließlich im Aszites erscheinen. Das Auftreten von ALP in Peritonealergüssen maligner Genese, das mit dem an Membranoberflächen von Leber, Darm, Lunge und Skelettmuskel (Abb. 16) vorkommenden LSP weitestgehend identisch scheint, kann in dieser Hinsicht gedeutet werden. Hohe Cholesterinspiegel könnten auf ausgedehnten peritonealen Befall, niedrige Titer auf eher lokal begrenztes Wachstum hindeuten. Eine direkte Korrelation ist bis jetzt allerdings nicht bewiesen (Martin, R., 1983).

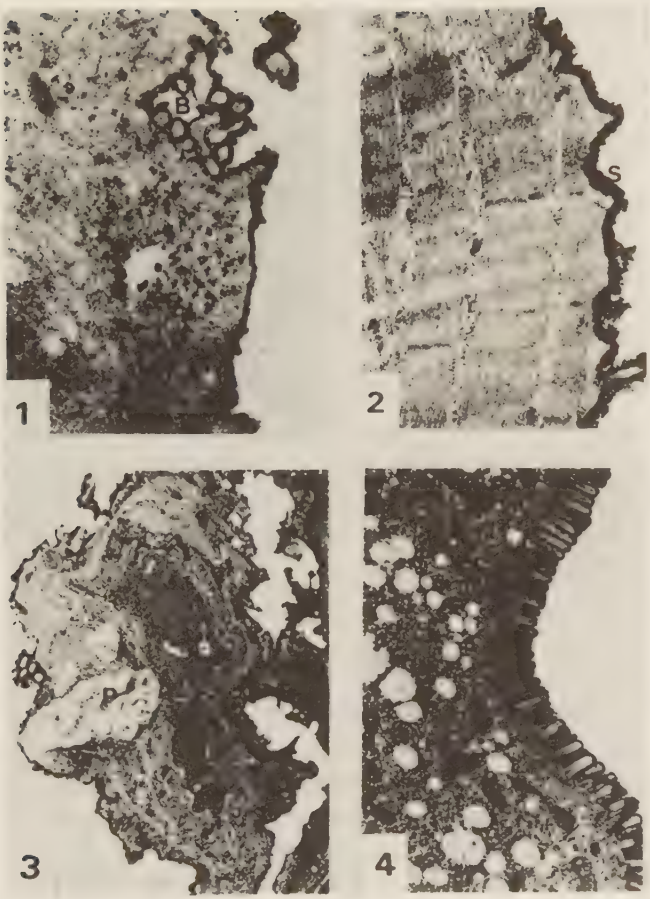


Abb. 16

Elektronenmikroskopischer Nachweis von Oberflächenantigenen an Zellmembranen einiger Organe endo- und mesodermalen Ursprungs
1 : Leber, B Gallenkanälchen (Vergr. 1:28000)
2 : Skelettmuskel, S Sarkolemm (Vergr. 1:12000)
3 : Lunge, P Pneumozyt (Vergr. 1:11000)
4 : Dünndarm, Bürstensaum (Vergr. 1:11000)
aus: Behrens, U.J., Paronetto, F., Liver-specific and shared cell membrane antigens, Studies by light- and electron microscopy, Immunology 35:289 (1978)

4.3.4. Ausblick

Nach neueren Untersuchungen findet man in Aszites von Patienten mit malignen Erkrankungen deutlich höhere Cholesterinspiegel als in Aszites benigner Genese (Martin, R., 1983). Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde weisen darauf hin, daß die Lipide im Aszites bei oben genannten Patienten in Form von Lipoproteinen bzw. Proteolipidkomplexen vorliegen. Nicht entschieden werden kann, ob es ein für Peritonealergüsse maligner Genese charakteristisches Lipoproteinmuster gibt, und welche Bedeutung dabei dem makromolekularen Asziteslipoprotein ALP zukommt. Hier sind vergleichende Studien an Patienten mit benignen Erkrankungen, z. B. Leberzirrhose und Aszites notwendig, um von der Grunderkrankung abhängige Unterschiede zu eruieren.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Frühere Untersuchungen wiesen darauf hin, daß Aszitеslipide in an Protein assoziierter Form vorliegen können (Suzuki, N. et al., 1980). Ähnlichkeiten zu Serumlipoproteinen machten Filtrationsvorgänge aus dem Plasma wahrscheinlich (Brenneman, D.E. et al., 1975). Ungeklärt blieben aber die teilweise erheblichen Unterschiede in Molekulargewicht, Zusammensetzung und Apoproteinen (Mathur, S.N., Spector, A.A., 1976).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, bei 30 Patienten mit verschiedenen malignen Erkrankungen und Aszites näher zu untersuchen, in welcher Form die Lipide im Aszites vorliegen, diese zu isolieren und zu charakterisieren, sowie Aussagen über ihre Herkunft zu treffen.

Der Eiweißgehalt des Aszites schwankte bei allen Patienten von 1,2 bis 7,4 g/dl. Die Gesamtcholesterinkonzentration lag zwischen 25,10 und 214,91 mg/dl. Eine wesentlich größere Spannweite wiesen die Triglyzerid- bzw. Phospholipidkonzentrationen mit 38,05 bis 715,84 mg/dl bzw. 30,15 bis 658,00 mg/dl auf. Der obere Extremwert der Neutralfette konnte durch Einbruch von Tumormetastasen in das lymphdrainierende System erklärt werden, der zu Übertritt von Lymphe in den Aszites geführt hatte.

Die positive Korrelation von Protein und Lipidkomponenten gab erste Hinweise für das Vorkommen von Lipoproteinen im Aszites. In allen Patientenkollektiven war ein signifikant ($p = 0,05$) positiver Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient zwischen Protein und Cholesterin und zwischen Protein und Triglyzeriden zu finden ($r_s = 0,701 - 0,939$). Unterstützt wurden diese Befunde durch die Gelfiltrationschromatographie, bei der ein Teil der Proteine mit den Lipiden an gleicher Stelle eluiert wurde, obwohl wegen unterschiedlicher Molekulargewichte getrenntes Erscheinen zu erwarten gewesen wäre. Weiteren Anhalt lieferten der elektrophoretische und immunologische Nachweis von Low Density Apoproteinen und High Density Apoproteinen sowie die Elektronenmikroskopie nach Negative Staining.

Zur Isolierung der Asziteslipoproteine wurde die Gelfiltrationschromatographie herangezogen. Auf einer Biogel A-5m-Säule ergab sich ein dreigipfliges Elutionsprofil, das der mit Hilfe von Serumlipoproteinen erstellten Eichkurve sehr ähnelte. Im zweiten bzw. dritten Peak wurde immunologisch und elektrophoretisch LDL bzw. HDL nachgewiesen. Der größte Anteil der Asziteslipide scheint in Form von Low Density Lipoproteinen vorzuliegen.
Der im Ausschlußvolumen eluierende makromolekulare erste Peak (MG > 5 Mill. D) reagierte in der Immundiffusion nur mit Anti-Albumin, auch nach Konzentrierung nicht mit Anti-Apoprotein A oder B, was eine Identität mit VLDL ziemlich unwahrscheinlich machte. Die Albuminkontamination konnte mittels Zentrifugation bei 50000 Upm reduziert, aber nicht völlig eliminiert werden.

Gleichzeitig diente die isopyknische Gradientenultrazentrifugation der Dichtebestimmung. Der hohe für das makromolekulare Aszites-lipoprotein ALP ermittelte Wert von 1,155 g/ml ließ sich gut mit dem großen Proteinanteil von ca. 66% vereinbaren, dürfte aber unter Nativbedingungen eher geringer sein, da bei der zur Konzentrierung des Aszites eingesetzten Ultrafiltration Lipide verlorengehen können. Mit ca. 20 % waren die Triglyzeride immer anteilsmäßig zweitstärkste Fraktion. Cholesterin bzw. Phospholipide nahmen in Abhängigkeit von dem zugrundeliegenden Krankheitsbild den zweiten bzw. dritten Rang ein.
Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ergab 10 - 11 Untereinheiten im Molekulargewichtsbereich zwischen 27000 und 98000 D für das makromolekulare Aszites-lipoprotein gynäkologischer und gastrointestinaler Karzinome. Eine Bande zeigte dieselbe Motilität wie Albumin. Apoproteine des Plasmas wurden nicht gefunden.
Der wesentliche Unterschied zwischen den einzelnen Karzinomtypen waren nicht malignomspezifische Untereinheiten sondern Differenzen in ihrer Konzentration. Dies ist im Rahmen der allen Patienten gemeinsamen Peritonealkarzinose verständlich.

Aufgrund großer bio- und physikochemischer Übereinstimmungen ist zu folgern, daß es sich bei den aus Peritonealergüssen verschiedener Genese isolierten makromolekularen Aszites-lipoproteinen um dieselbe Substanz handelt. Diese zeigte eine deutliche immunologische Reaktion mit gegen membranständige Leberzelloberflächenantigene gerichtetem LSP-Antiserum.

Auch die Proteinanalytik und das elektronenmikroskopisch errechnete Molekulargewicht von ca. 45 Mill. D machten eine Identität von ALP und LSP wahrscheinlich.

Viele Entsprechungen zwischen Ergußflüssigkeit und Plasma wie z. B. das Vorkommen von Albumin und Serumlipoproteinen deuten auf eine plasmatische Herkunft von Asziteslipoproteinen. Ein weiterer Ursprungsort sind Oberflächenmembranen oder das Zellinnere von Organen, bei denen die lokale Tumorinfiltration zur Loslösung von zellulären Lipoproteinen geführt hat. Dies würde das Auftreten von LSP im Aszites maligner Genese erklären.
Nicht entschieden werden kann dagegen, ob es ein für Peritonealergüsse maligner Genese charakteristisches Lipoproteinmuster gibt. Hier sind vergleichende Untersuchungen an Patienten mit benignen Erkrankungen und Aszites notwendig, um von der Grunderkrankung abhängige Unterschiede zu eruieren.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Ackers, G.K.:
Molecular exclusion and restricted diffusion processes in molecular-sieve chromatography.
Biochemistry 3:723 (1964)

2. Barclay, M., Skipski, V.P.:
Lipoproteins in relation to cancer.
In: Progr. biochem. pharmacol. 10:76 (1975)

3. Behrens, U.J., Paronetto, F.:
Liver-specific and shared cell membrane antigens, Studies by light- and electron microscopy.
Immunology 35:289 (1978)

4. Behrens, U.J., Paronetto, F.:
Studies on "Liver-specific" antigens, I. Evaluation of the liver specifity of "LSP" and "LP-2".
Gastroenterology 77:1045 (1979)

5. Brenneman, D.E., Spector, A.A.:
Utilization of ascites plasma very low density lipoprotein triglycerides by Ehrlich cells.
J. Lip. Res. 15:309 (1974)

6. Brenneman, D.E., Mathur, S.N., Spector, A.A.:
Characterization of the hyperlipidemia in mice bearing the Ehrlich ascites tumor.
Europ. J. Cancer 11:225 (1975)

7. Clausen, J.:
Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules.
In: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology (T.S. Work and E. Work, Eds.).
American Elsevier, New York (1969)

8. Chrainbach, A., Rodbard, D.:
Polyacrylamide gel electrophoresis.
Science 172:440 (1971)

9. Christensen Lou, H.O., Clausen, J., Bierring, F.:
Phospholipids and glycolipids of tumors in the central nervous system.
J. Neurochem. 12:619 (1965)

10. Eggstein, M.:
Eine neue Bestimmung der Neutralfette im Blutserum und Gewebe.
Klin. Wschr. 44:267 (1966)

11. Ferguson, K.A.:
Starch-gel electrophoresis-application to the classification of pituitary proteins and polypeptides.
Metabolism 10:985 (1964)

12. Fiske, C.H., Subbarow, Y.:
The colorimetric determination of phosphorus.
J. Biol. Chem. 64:375 (1925)

13. Folch, J.:
A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.
J. Biol. Chem. 222:497 (1956)

14. Foreman, J.R., Karlin, J.B., Edelstein, C., Juhn, J.Y., Rubenstein, A.H., Scanu, A.M.:
Fractionation of human serum lipoproteins by single-spin gradient ultracentrifugation: quantification of apolipoproteins B and A-I and lipid components.
J. Lip. Res. 18:759 (1977)

15. Gabriel, O.:
Analytical disc gel electrophoresis.
In: Methods in enzymology, Vol. 2 (W.B. Jakoby, Ed.).
Academic Press, New York, 565 (1971)

16. Gofman, J.W., Lindgren, F.T., Elliott, H.A.:
Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum.
J. Biol. Chem. 179:973 (1949)

17. Griffith, O.M.:
Techniques of preparative zonal and continuous flow ultracentrifugation.
Applications Research Department, Spinco Division, Beckman instruments Inc., Palo Alto, Calif., 5 (1976)

18. Hölzl, J.:
Pharmacokinetic studies on phosphatidylcholine and phosphatidylinositol.
In: Phosphatidylcholine-Biochemical and clinical aspects of essential phospholipids (H. Peters, Ed.), 66 (1976)

19. Hoffmann, F.A.:
Ober den Eiweißgehalt der Aszitesflüssigkeiten.
Virchows Archiv 78:250 (1879)

20. Jackson, R.L., Stein, O., Gotto, A.M., Stein, Y.:
A comparative study on the removal of cellular lipids from Landschütz ascites cells by human plasma apolipoproteins.
J. Biol. Chem. 250:7204 (1975)

21. Jones, O.C., Price, J.M.:
Some methods of electron microscopic visualization of lipoproteins in plasma and chyle.
J. Histochem. Cytochem. 16:366 (1968)

22. Kakumu, S., Arakawa, Y., Goji, H., Kashio, T., Yata, K.:
Occurence and significance of antibody to liver-specific membrane lipoprotein by double-antibody immunoprecipitation method in sera of patients with acute and chronic liver diseases.
Gastroenterology 76:665 (1979)

23. Kelley jr., M.L.:
Chylous ascites: an analysis of its etiology.
Gastroenterology 39:161 (1960)

24. Lamerz, R., Fateh-Moghadam, A.:
Quantitative Immunglobulinbestimmungen, Grundlagen- Methodik- Bewertung.
Das medizinische Laboratorium 11:243 (1969)

25. Lindgren, F.T., Jensen, L.H., Hatch, F.T.:
The isolation and quantitative analysis of serum lipoproteins.
In: Blood lipids and lipoproteins: Quantitation, composition and metabolism (G.J. Nelson, Ed.), 181 (1972)

26. Lowry, O., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.:
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193:265 (1951)

27. Malmendier, C.L., Amerijckx, J.P.:
Apoprotein profile of plasma and chylous ascites lipoproteins.
Clin. Chim. Acta 68:259 (1976)

28. Malmendier, C.L., Amerijckx, J.P., Van den Berg, C.J.:
Metabolism of lipoproteins in human chylous ascites. Kinetic and static studies of lipids and apoproteins.
Clin. Chim. Acta 77:227 (1977)

29. Martin, R.:
Zur diagnostischen Bedeutung von Cholesterin, Triglyzeriden, Phospholipiden und Protein im Aszites.
Dissertationsschrift an der Ludwig-Maximilians-Universität München, 1983

30. Mathur, S.N., Spector, A.A.:
Characterization of the Ehrlich ascites tumor plasma lipoproteins.
Biochim. Biophys. Acta 424:45 (1976)

31. Mathur, S.N., Spector, A.A.:
Effects of dietary fat composition on the Ehrlich ascites tumor fluid lipoproteins.
J. Lipid Res. 19:457 (1978)

32. McFarlane, I.G., Wojcicka, B.M., Zucker, G.M., Eddleston, A.L.W.F., Williams, R.:
Purification and characterization of human liver-specific membrane lipoprotein (LSP).
Clin. Exp. Immunol. 27:381 (1977)

33. Meyer zum Büschenfelde, K.H., Miescher, P.A.:
Liver specific antigens, Purification and characterization.
Clin. Exp. Immunol. 10:89 (1972)

34. Meyer zum Büschenfelde, K.H., Kossling, F.K., Miescher, P.A.:
Experimental chronic active hepatitis in rabbits following immunization with human liver proteins.
Clin. Exp. Immunol. 11:99 (1972)

35. Nath, K.:
Diagnostic value of ascitic fluid examination.
J. Ass. Physns. India 16:991 (1968)

36. Nix, J.T.:
Chylothorax and chylous ascites; a study of 302 selected cases.
Am. J. Gastroent. 28:40 (1957)

37. Ouchterlony, D.:
Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis.
Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, MI. 21 (1969)

38. Paddock, F.K.:
The diagnostic significance of serous fluids in disease.
N. Eng. J. Med. 223:1010 (1940)

39. Pillay, V.K.:
Diagnostic significance of protein concentration in serous fluids.
S. Afr. Med. J. 37:379 (1963)

40. Polak, M.:
Diagnostic value of the biochemical profile (protein, cholesterol, glucose, mucoprotein, amylase) of ascitic fluid.
Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo 33:186 (1978)

41. Reuss, A.:
Breiträge zur klinischen Beurteilung von Exsudaten und Transsudaten.
Deutsch. Arch. Klin. Med. 24:583 (1879)

42. Reuss, A.:
Das Verhältnis des spezifischen Gewichts zum Eiweißgehalt in serösen Flüssigkeiten.
Deutsch. Arch. Klin. Med. 28:317 (1881)

43. Röschlau, P., Bernt, E., Gruber, W.:
9th Int. Congr. on Clin. Chemistry, Toronto, Abstract No. 1 (1975)

44. Rovelstad, R.A., Bartholomew, L.G., Cain, J.C., McKenzie, B.F., Soule, E.H.:
The value of examination of ascitic fluid and blood for lipids and for proteins by electrophoresis.
Gastroenterology 34:436 (1958)

45. Runeberg, J.W.:
Klinische Studien über Transsudatprozesse im Organismus; 1. Über den Eiweißgehalt der Aszitesflüssigkeiten.
Deutsch. Arch. Klin. Med. 34:1 (1884)

46. Sampliner, R.E., Iber, F.L.:
High protein ascites in patients with uncomplicated hepatic cirrhosis.
Am. J. Med. Sciences 267:275 (1974)

47. Sata, D., Havel, R.J., Jones, A.L.:
Characterization of subfractions of triglyzeride-rich lipoproteins separated by gel chromatography from blood plasma of normolipemic and hyperlipemic humans.
J. Lipid Res. 13:757 (1972)

48. Spector, A.A.:
Fatty acid metabolism in tumors.
Progr. Biochem. Pharmacol. 10:42 (1975)

49. Stein, Y., Stein, O.:
Lipid synthesis and degradation and lipoprotein transport in mammalian aorta.
In: A Ciba Foundation Symposium: Atherogenesis: Initiating factors 12:165 (1973)

50. Suzuki, N., Kawashima, S., Deguchi, K., Ueta, N.:
Low density lipoproteins from human ascites plasma. Characterization and degradation by sodium deoxycholate.
J. Biochem. (Tokio) 87:1253 (1980)

51. Swaney, J.B., Vande Wonde, G.F., Bachrach, H.L.:
Sodium dodecylsulfate-dependent anomalies in gel electrophoresis: Alterations in banding patterns of foot-and-mouth disease virus polypeptides.
Anal. Biochem. 58:337 (1974)

52. Takemura-Hattori, R., Yamazaki, M., Kurisu, M., Mizuno, D.:
Depression of macrophage function by lipoprotein from tumorous ascites.
Gann 71:206 (1980)

53. Tavel, M.E.:
Ascites: Etiologic considerations with emphasis on the value of several laboratory findings in diagnosis.
Am. J. Med. 237:727 (1959)

54. Thomson, A.D., Lochrane, A.M.G., McFarlane, J.G., Eddleston, A.L.W.F., Williams, R.:
Lymphocyte cytotoxity to isolated hepatocytes in chronic active hepatitis.
Nature 252:721 (1974)

55. Trautman, R.:
Determination of density gradients in isodensity equilibrium ultracentrifugation.
Arch. Biochim. Biophys. 87:289 (1960)

56. Weber, K., Osborn, M:
The reliability of molecular weight determinations by dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
J. Biol. Chem. 244:4406 (1969)

57. Weiss, J.F.:
Sterols and other lipids in tumors of the nervous system.
In: Progr. biochem. pharmacol. 10:227 (1975)

58. Zähringer, J., Kandolf, R., Raum, W., Troesch, G., Stäb, G., Jäger, E.:
Isolation and characterization of structurally and functionally intact polyribosomes and mRNA from rat heart muscle.
J. Mol. Cell. Cardiol. 13:127 (1981)

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. D. Jüngst für die Uberlassung des Themas und die Betreuung während der Arbeit.

Frau B. Häuserer bin ich für Einweisung und technische Hilfe im Labor dankbar.

Darüberhinaus möchte ich Frau Dr. U. Behrens, Immunopathology Laboratory, VA Medical Center Bronx, New York für die Bereitstellung des LSP-Antiserums sowie Herrn PD Dr. E. Siess, Institut für Diabetesforschung, München, für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Abbildungen danken.

Abschließend gilt mein Dank allen Ärztinnen und Ärzten, Schwestern und Pflegern der Medizinischen Kliniken I - III sowie der Frauenklinik des Klinikums Großhadern, München, die mich bei der Sammlung des Aszites unterstützt haben.

L E B E N S L A U F

Am 14. Februar 1958 wurde ich als Sohn des jetzigen Vizepräsidenten des Landgerichts a.D. Dr. jur. Helmut Caselmann und seiner Ehefrau Ingrid, geb. Rausch in Bayreuth geboren.

Von 1964 bis 1968 besuchte ich die Jean-Paul-Volksschule in Bayreuth. Danach wechselte ich in das Gymnasium Christian-Ernestinum über, an dem ich 1977 das Abitur ablegte.

Im November des gleichen Jahres nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen auf. Im August 1979 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung, ein Jahr später den ersten Teil der Ärztlichen Prüfung. Für den zweiten klinischen Studienabschnitt wechselte ich an die Ludwig-Maximilians-Universität München und legte im März 1983 den zweiten Teil der Ärztlichen Prüfung ab.

Das folgende Praktische Jahr absolvierte ich an der Medizinischen Klinik II des Klinikums Großhadern, München, der Chirurgischen Klinik Rosenheim und der Urologischen Klinik des Klinikums Großhadern, München.

Den dritten Teil der Ärztlichen Prüfung werde ich 1984 ablegen.

Mit den Untersuchungen zu vorliegender Arbeit begann ich im Oktober 1980 und konnte sie drei Jahre später beenden.

Wolfgang Caselmann

München, im Oktober 1983